# Die enzymatische Oxydation der 3-Hydroxy-anthranilsäure

Erich Kuß

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0036

# DIE ENZYMATISCHE OXYDATION DER 3-HYDROXY-ANTHRANILSÄURE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt

von

Erich Kuss

aus

Wanne-Eickel

---

Juni 1959

Dekan: Prof. Dr. L. Brauner
Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 29. JULI 1959

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Butenandt in der Zeit von 1957 bis 1959 im Max-Planck-Institut für Biochemie, München, durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Butenandt und Herrn Dr. Hecker danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit.

A. Allgemeiner Teil

I. Biologischer Rahmen und chemische Aufgabe
II. Synthese der Vergleichssubstanz β-Carboxy-lysin
III. Die enzymatische Reaktion
IV. Isolierung und Charakterisierung des Zwischenproduktes als 2. 4-Dinitrophenylhydrazon
V. Identifizierung des Zwischenproduktes durch Reduktion des Dinitrophenylhydrazons zu β-Carboxy-lysin

B. Beschreibung der Versuche

C. Zusammenfassung

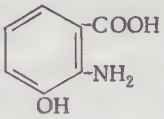
# A. ALLGEMEINER TEIL [+)]

[+)] Als Abkürzung wurde verwendet: DNP = Dinitrophenyl

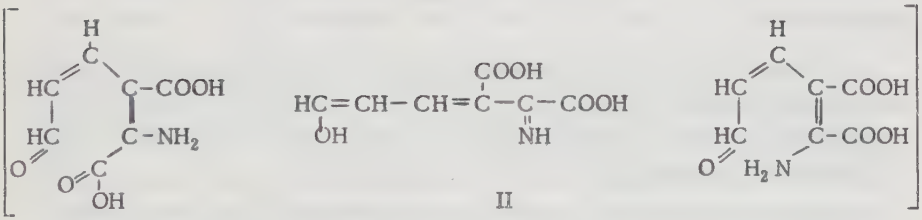
## I. Biologischer Rahmen und chemische Aufgabe

Die 3-Hydroxy-anthranilsäure (I) ist ein Produkt des Tryptophanstoffwechsels [1] und ein Glied der biologisch bedeutsamen Reaktionskette, die von der essentiellen Aminosäure Tryptophan zum essentiellen Metaboliten Niacin führt [2]. 3-Hydroxy-anthranilsäure war die letzte Vorstufe der Nicotinsäure (III), die durch in vivo Experimente mit Mikroorganismen [3] und mit Säugetieren [4] ermittelt werden konnte.

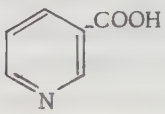
1949 postulierten BONNER und YANOFSKY [5] als Zwischenprodukt der enzymatischen Umwandlung von 3-Hydroxy-anthranilsäure (I) in Nicotinsäure (III) den $\alpha$-Amino-$\beta$-carboxy-muconsäure-halbaldehyd-($\omega$) (II), der durch oxydative Spaltung der 3-Hydroxy-anthranilsäure entstehen kann. Nach der enzymatischen Spaltung würde eine cis-trans-Umlagerung über die Ketiminform dieses Enamins (II) die intramolekulare Kondensation zu den Pyridin-carbonsäuren Nicotinsäure (III), Chinolinsäure (IV) und Picolinsäure (V) ermöglichen.



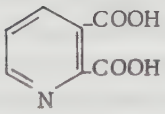

I



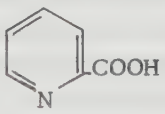

II




III




IV




V

---

1 Übersicht: Amino Acid Metabolism (Baltimore 1955) und A. Butenandt, Angew. Chem. 69, 16 (1957)

2 Übersicht: C. E. Dalgliesh, 4. Internat. Kongress f. Biochem. (Wien 1958)

3 H. K. Mitchell et al., Proc. nat. Acad. Sci. USA 34, 1 (1948) und D. M. Bonner, Proc. nat. Acad. Sci. USA 34, 5 (1948)

4 H. K. Mitchell et al., J. biol. Chemistry 175, 433 (1948) und L. V. Hankes, Arch. Biochem. Biophysics 52, 484 (1954)

5 D. M. Bonner und Ch. Yanofsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 35, 576 (1949)

Dieser Hypothese entspricht die Isotopenverteilung in Pyridin-carbonsäure-Derivaten, die von Versuchstieren nach Gabe von markiertem Tryptophan oder markierter 3-Hydroxy-anthranilsäure ausgeschieden werden. Die quantitative Auswertung der Versuche zeigt aber auch, dass der grösste Teil der 3-Hydroxy-anthranilsäure auf bisher unbekanntem Stoffwechselwege, möglicherweise über das Zwischenprodukt (II), der Endoxydation zugeführt wird [2,6].

1951 wurde durch in vitro Versuche ein wesentlicher Fortschritt im Studium der Nicotinsäure-Biosynthese aus 3-Hydroxy-anthranilsäure erzielt. BOKMAN und SCHWEIGERT [7] konnten nach Inkubieren von 3-Hydroxy-anthranilsäure mit Enzym-Präparaten aus Rattenleber erstmalig spektrophotometrisch ein Zwischenprodukt nachweisen. (Absorptionsmaximum bei 360 mμ, in Pufferlösung $p_H$ 7.4). WISS ermittelte 1954 für die molare Extinktion dieses Zwischenproduktes den Wert 47 500 [8]. Diese Befunde stimmen gut mit der postulierten Struktur (II) des Zwischenproduktes überein.

Einen weiteren Hinweis auf die Art des Zwischenproduktes liefert die Messung des Sauerstoff-Verbrauches der Reaktion. HENDERSON et al. [13], WISS et al. [8] und MEHLER [9] konnten in Übereinstimmung mit der Annahme von II als Zwischenprodukt den Verbrauch von einem Mol Sauerstoff pro Mol 3-Hydroxy-anthranilsäure nachweisen. Versuche mit $^{18}O$ zeigten, dass bei der enzymatischen Oxydation der 3-Hydroxy-anthranilsäure der Luftsauerstoff direkt in das Substrat eingebaut wird [10].

Die postulierte Struktur II wurde ausserdem durch Umwandlung des bei 360 mμ absorbierenden Zwischenproduktes in Chinolinsäure (IV) [7] und Picolinsäure (V) [9] wahrscheinlich gemacht. Nicotinsäure (III) konnte bisher nicht in vitro aus dem Zwischenprodukt dargestellt werden.

In der neueren Literatur über die enzymatische Spaltung der 3-Hydroxy-anthranilsäure ist lediglich eine Arbeit zu finden, die im Widerspruch zu der Annahme der intermediären Bildung des α-Amino-β-carboxy-muconsäure-halbaldehyds (II) steht. HARRIS und BINNS [11] glauben durch Fütterungsversuche nachgewiesen zu haben, dass bei Xanthomonas pruni die α-Amino-methyl-muconsäure als Zwischenprodukt auftritt.

---

6 L. M. Henderson et al., J. biol. Chemistry 230, 179 (1958)

7 A. H. Bokman u. B. S. Schweigert, Arch. Biochem. Biophysics 33, 270 (1951)

8 O. Wiss et al., Hoppe-Seyler s Z. physiol. Chem. 304, 221 (1956)

9 A. H. Mehler, J. biol. Chemistry 218, 241 (1956) und 4. Internat. Kongress f. Biochemie (Wien 1958)

10 O. Hayaishi et al. Am. chem. Soc. Meeting 1956, Ref.: Advances in Enzymol. 19, 96 (New York 1957)

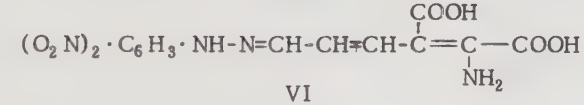
11 J. O. Harris u. F. Binns, Nature (London) 179, 475 (1957)

Es ist von verschiedenen Autoren versucht worden, das extrem instabile Zwischenprodukt II zu isolieren, um seine Struktur endgültig zu beweisen. 1954 berichteten SCHWEIGERT et al. [12] und HENDERSON et al. [13], dass es ihnen nicht möglich war, mit Hilfe von Carbonylreagenzien ein Derivat des Zwischenproduktes darzustellen. Die Autoren konnten nur das Dinitrophenylhydrazon eines „denaturierten Zwischenproduktes" isolieren.

Das nicht weiter identifizierte „denaturierte Zwischenprodukt" entsteht durch Säurezusatz irreversibel aus dem Zwischenprodukt. (Absorptionsmaximum bei 375 mμ, in Pufferlösung $p_H$ 7.5).

Aus diesen Befunden schlossen die Autoren, dass das bei 360 mμ absorbierende Zwischenprodukt keine Carbonylgruppe enthält.

1956 setzten WISS und BETTENDORF [14] das Zwischenprodukt bei 0° mit Dinitrophenylhydrazin um und isolierten ein Derivat, das dem Dinitrophenylhydrazon (VI) des erwarteten Zwischenproduktes (II) entsprechen sollte.



VI

Die Ergenisse der Elementaranalyse dieses Dinitrophenylhydrazons sind nicht ganz eindeutig. Auch entspricht die Lage seines Absorptionsmaximums nicht der aus der folgenden Tabelle ersichtlichen Gesetzmässigkeit, in die sich die spektralen Daten des Zwischenproduktes selbst dagegen gut einordnen lassen. Ausserdem erscheint es wegen der bekannten Instabilität der Enamine in saurem Milieu fraglich, ob das Zwischenprodukt unter den angegebenen Versuchsbedingungen unverändert blieb. Man kann daher nicht entscheiden, ob von den Autoren das Dinitrophenylhydrazon des Zwischenproduktes oder das Dinitrophenylhydrazon des „denaturierten Zwischenproduktes" dargestellt wurde, zumal ein Vergleich der von WISS beschriebenen Substanz mit dem von SCHWEIGERT isolierten Dinitrophenylhydrazon des „denaturierten Zwischenproduktes" nicht möglich ist, da die entsprechenden Angaben fehlen:

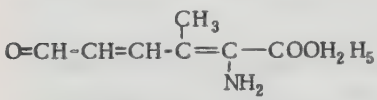
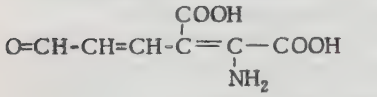
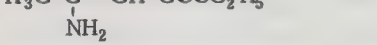
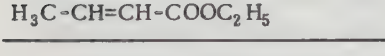
SCHWEIGERT [12] : Schmp. 163-170°; $\lambda_{max}$: nicht angegeben.
WISS [14] : Schmp. nicht angegeben; $\lambda_{max}$: 405 mμ.

---

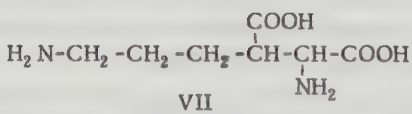
[12] B. S. Schweigert et al., J. biol. Chemistry 211, 391 (1954)
[13] L. M. Henderson et al., J. biol. Chemistry 211, 405 (1954)
[14] O. Wiss u. G. Bettendorf, Hoppe-Seyler s Z. physiol. Chem. 306, 145 (1957)

Tab. 1

U. V. -Absorptionsmaxima einiger ungesättigter Verbindungen
a) in Alkohol, b) in Phosphatpuffer $p_H$ 7. 4, c) in Chloroform

| | $\lambda_{max}$ | $\lambda_{max}$ des Dinitrophenylhydrazons | Lit. |
|---|---|---|---|
| O=CH-CH=CH-$CH_3$ | a) 217 mμ | a) 373 mμ | 15 |
| O=CH-CH=CH-CH=CH-$CH_3$ | a) 263 | a) 390 | 16 |
|  | a) 342 | c) 420 | 19 |
|  | b) 360<br>a) 340 | a) (405) | 12, 14<br>13, 16 |
|  | a) 275 | --------- | 17 |
|  | a) 210 | --------- | 18 |

Um die Konstitution des Zwischenproduktes II eindeutig zu klären, muss sein Dinitrophenylhydrazon VI unter milden Bedingungen aus enzymatischen Ansätzen isoliert und seine Struktur bewiesen werden. Dieses Ziel sollte dadurch erreichbar sein, dass man durch Hydrieren der Doppelbindungen und Hydrogenolyse der Stickstoff-Stickstoffbindung die unbeständige Verbindung VI in eine gesättigte stabile Diamino-dicarbonsäure, in das bisher unbekannte β-Carboxy-lysin VII überführt und damit identifiziert.



VII

15 A. Braude et al., J. chem. Soc. 1945, 498

16 Diese Arbeit

17 C. A. Grob, Helv. chim. Acta 33, 1787 (1950)

18 W. D. Paist et al., J. org. Chemistry 6, 273 (1941)

19 F. Bohlmann u. D. Rahtz, Chem. Ber. 90, 2265 (1957)

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Vergleichssubstanz $\beta$-Carboxylysin auf strukturbeweisendem Wege darzustellen, das Dinitrophenylhydrazon des als $\alpha$-Amino-$\beta$-carboxy-muconsäurehalbaldehyd-($\omega$) angesprochenen Zwischenproduktes aus enzymatischem Ansatz zu isolieren und dieses Derivat durch eine übersichtliche Reaktion in die Vergleichssubstanz umzuwandeln.

## II. Synthese der Vergleichssubstanz β-Carboxy-lysin

Die Darstellung des β-Carboxy-lysins (VII) gelang auf drei verschiedenen Synthesewegen ( siehe Formelschema im Anhang).

### a) Die Ausgangssubstanzen.

Die Schlüsselsubstanz für die folgenden Synthesen ist das Piperidon-(2) (VIII), das aus Cyclopentanon durch Umlagerungsreaktionen hergestellt wurde:

1. durch die Schmidtsche Reaktion [20] aus Cyclopentanon und Stickstoffwasserstoffsäure. Das Piperidon-(2) (VIII) wurde isoliert, zum Hydrochlorid der δ-Amino-valeriansäure (IX) verseift, die mit Phthalsäureanhydrid [21] zur δ-Phthalimidovaleriansäure (X) acyliert wurde.
2. durch die Beckmannsche Umlagerung [22] von Cyclopentanon-oxim. Anschliessend wurde nach der Vorschrift von FOX und DUNN [23] verseift, mit Benzoylchlorid umgesetzt und so die δ-Benzaminovaleriansäure (X a) dargestellt, ohne Zwischenstufen zu isolieren.

### b) Die Kondensations-Vorprodukte.

N-Benzoyl-piperidon-(2) (XI) wurde nach SPÄTH und MAMOLI [24] durch Zusammenschmelzen von Piperidon mit Benzoesäure-anhydrid erhalten.

Die δ-Phthalimido-valeriansäure (X) und die δ-Benzamino-valeriansäure (X a) wurden mit Diazomethan oder mit Methanol und Mineralsäure zu XII und XII a verestert.
Zur Darstellung des α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-methylesters (XIII) [21] wurde X bromiert und durch Alkoholyse des α-Brom-carbonsäurebromids mit Methanol verestert. Bei den Versuchen zur Halogenierung von X a konnte nur α,α-Dibrom-piperidon als kristallisiertes Reaktionsprodukt erhalten werden.

---

[20] H. Shechter u. J. C. Kirk, J. Am. chem. Soc. 73, 3087 ( 1951)
[21] R. Gaudry u. L. Berlinguet, C. A. 45, 2469 (1951)
[22] O. Wallach, Liebigs Ann. Chem. 312, 171 (1900)
[23] W. Fox u. S. Dunn, J. org. Chemistry 6, 410 (1941)
[24] E. Späth u. L. Mamoli, Chem. Ber. 69, 1082 (1936)

c) Die Kondensationsprodukte.

Das N-Benzoyl-piperidon-(2) (XI) lässt sich mit Oxalsäuredimethylester in siedendem Toluol in Gegenwart von Natriumhydrid kondensieren. Das bisher nicht beschriebene N-Benzoyl-3-methoxalyl-piperidon-(2) (XIV) wurde isoliert und in der üblichen Weise zum Dinitrophenylhydrazon XVII umgesetzt.

Die Kondensation des δ-Phthalimido-valeriansäure-methylesters (XII) mit Oxalsäure-dimethylester wurde mit Natriumhydrid in siedendem Benzol durchgeführt. Der bisher nicht bekannte δ-Phthalimido-α-methoxalyl-valeriansäure-methylester (XV) konnte isoliert werden, sein Dinitrophenylhydrazon (XVIII) wurde nach der üblichen Methode dargestellt.

Der Ketoester XV a, das Reaktionsprodukt der Kondensation von δ-Benzamino-valeriansäure-methylester mit Oxalsäuredimethylester wurde selbst nicht kristallisiert erhalten, sondern nur seine Derivate, das Phenylhydrazon XVIII a und das Dinitrophenylhydrazon XVIII b.

Die Kondensation von α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-methylester (XIII) mit Formamino-malonsäure-dimethylester konnte so gelenkt werden, dass sie den erwarteten, bisher nicht beschriebenen Tricarbonsäure-ester XVI als Hauptprodukt liefert.

Zum Studium dieser bisher nicht beschriebenen Variation einer Sörensen-Synthese wurden zwei Modellreaktionen durchgeführt, an denen je einer der Reaktionspartner der Hauptreaktion unverändert, der andere ohne die möglicherweise störende funktionelle Gruppe teilnahm:

Es wurde α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-methylester mit Malonsäure-dimethylester kondensiert. Das erwartete, bisher nicht beschriebene Reaktionsprodukt, ε-Phthalimido-α,β-dicarbomethoxy-capronsäure-methylester, wurde isoliert.

Es wurde α-Brom-buttersäure-ester mit Formamino-malonsäure-dimethylester kondensiert. Das erwartete, bisher nicht beschriebene Reaktionsprodukt, α-Formamino-α,β-dicarbomethoxy-valeriansäure-methylester, wurde isoliert.

Der planmässige Verlauf der Reaktionen zeigte, dass keine der funktionellen Gruppen die Sörensen-Kondensation von α-Brom-carbonsäure-ester mit Malonsäure-Derivaten störend beeinflusst.

d) Die Aminosäure β-Carboxy-lysin.

Zur Reduktion von XVIII zu β-Carboxy-lysin (VII) wurden zunächst die in der Literatur [25] beschriebenen Methoden der Darstellung von Aminosäuren aus den entsprechenden Phenylhydrazonen angewendet (vgl. Teil B). Diese Versuche führten nicht zum Erfolg. Da XVIII als C-alkyliertes Oxalessigester-phenylhydrazon aufgefasst werden kann, wurden Modellreaktionen zur Hydrogenolyse mit Oxalessigester-phenylhydrazon und -dinitrophenylhydrazon durchgeführt: häufig wurden Pyrazolone anstelle der erwarteten Asparaginsäure-Derivate isoliert. Selbst bei der Chromatographie von Oxalessigester-phenylhydrazon an neutralem Aluminiumoxyd, Aktivität IV-V, wurde 1-Phenyl-pyrazolon-(5)-3-carbonsäure-äthylester eluiert.

Die Versuche zur Reduktion der Modellsubstanzen ergaben schliesslich, dass Methanol-10% Salzsäure als das günstigste Lösungsmittel für eine durch Platin katalysierte reduzierende Spaltung der Phenylhydrazone mit Oxalessigester-Struktur angesehen werden kann: Oxalessigester-phenylhydrazon und -dinitrophenyl-hydrazon wurden in diesem Lösungsmittel hydriert, nach dem Verseifen war Asparaginsäure papierchromatographisch nachzuweisen.

Bei der Hydrierung von XVIII in Methanol-10% Salzsäure wurde aus der ursprünglich gelben Suspension eine klare grüne Lösung, die sich an der Luft braunrot färbte. Die Farbstoffkomponenten konnten durch Säulenchromatographie in mehrere Banden aufgetrennt werden, die durch Hydrierung entstandene Aminosäure war nach dem Verseifen papierchromatographisch nachzuweisen. Analoges gilt für die Reduktion von XVIII a und XVIII b.

Das Versagen der in der Literatur [25] beschriebenen Methoden zur reduktiven Spaltung der Phenylhydrazone wurde auf die Oxalessigester-Konfiguration der hier untersuchten Verbindungen zurückgeführt.

Auch KNOOP [26] hatte keinen Erfolg bei seinen Versuchen zur reduzierenden Aminierung des Oxalessigsäureesters, obwohl er die freie Säure in Asparaginsäure überführen konnte.

Mit der Synthese von XIV bzw. XVII sollte die kritische Oxalessigester-Konfiguration umgangen werden. Bei XVII ist die β-Carboxylgruppe des Keto-dicarbonsäurederivates, die zur Pyrazolonbildung tendiert, durch intramolekulare

[25] E. Fischer et al., Liebigs Ann.Chem. 383, 363 (1911); J. Tafel, Chem.Ber. 19, 2414 (1886); A.J. Virtanen et al., Acta chem.scand. 9, 188 (1955); E.Kun et al., Biochim.biophysica Acta 23, 181 (1957); G.H.N. Towers et al., J.Am.chem.Soc. 76, 2392, (1954)

[26] F.Knoop et al., Hoppe-Seyler s.Z.physiol.Chemie 148, 294 (1925)

Bindung in einem Sechsring-Lactam festgelegt. Damit war die Pyrazolonbildung als Konkurrenzreaktion der hydrogenolytischen Spaltung ausgeschlossen. Bei der katalytischen Reduktion von XVII wurde die Aminosäure (VII) in wesentlich höherer Ausbeute erhalten als nach der analogen Reaktion mit XVIII.

Das Produkt der Acylamino-malonester-Kondensation, der Tricarbonsäureester XVI, wurde mit Salzsäure verseift und decarboxyliert. Der anschliessende papierchromatographische Test des Hydrolysates zeigte nur einen ninhydrinpositiven Fleck.

Durch Papierchromatographie und Elektrophorese wurde die Identität der auf den verschiedenen Wegen dargestellten Aminosäure nachgewiesen. Bei der Übersichtlichkeit der Synthesewege beweist dieser Befund neben dem Ergebnis der Elementaranalyse des DNP-Derivates der Aminosäure, dass der synthetisierten Verbindung die Struktur (VII) des $\beta$-Carboxy-lysins zukommt.

Der papierchromatographische Identitätsbeweis kennzeichnet den eigentlichen Wert der verschiedenen Synthesewege. Zur Darstellung von $\beta$-Carboxy-lysin in präparativem Masstab ist der über die Sörensen-Kondensation verlaufende Syntheseweg zu bevorzugen.

e) Zur Stereochemie der Aminosäure.

Trennung der diastereomeren Bis-DNP-Derivate.

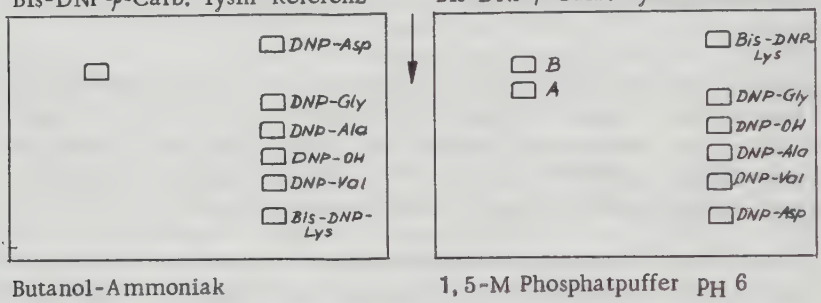
Im $\beta$-Carboxy-lysin sind zwei asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten. Von der synthetisierten Aminosäure sind also vier optisch aktive Formen zu erwarten, von denen zwei einem Racemat A, die beiden anderen einem Racemat B angehören. Da die beiden Racemate zueinander im Verhältnis der Diastereomerie stehen, ist eine Trennung auf Grund der Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften möglich.

Ein hoher Trenneffekt kann von der Papierchromatographie der farbigen Dinitrophenyl-Derivate erwartet werden; es ist bekannt, dass aromatische Gruppen die papierchromatographische Trennung stereoisomerer Aminosäuren begünstigen [27]. Es wurde daher das Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin nach der von SANGER [28] entwickelten Methode dargestellt. Die Papierchromatographie der DNP-Derivate zeigte, dass sich die aus XVI, XVII und XVIII gewonnenen DNP-Aminosäuren, wie erwartet, identisch verhalten. Dieser Befund ergänzt das Ergebnis der Papierchromatographie der Aminosäuren und bestätigt ebenfalls die Identität der auf verschiedenen Wegen dargestellten Aminosäure.

Das folgende Bild zeigt das papierchromatographische Verhalten des synthetisierten Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysins und anderer DNP-Derivate.

Abb. 1

Papierchromatographie von Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin neben anderen DNP-Derivaten, absteigend, auf SS 2043b.




Man erkennt, dass durch Papierchromatographie mit dem System 1,5-M Phosphatpuffer eine Auftrennung des Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysins in das schneller wandernde Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin A und das langsamer wandernde Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin B erzielt wurde.

Das Entstehen von zwei Flecken entspricht einer echten Trennung zweier verschiedener Substanzen und nicht einem täuschenden Effekt des Lösungsmittels[29], denn bei der Rechromatographie der isolierten Substanzen im gleichen System erfolgt keine weitere Auftrennung.

Durch Elektrophorese wurde bewiesen, dass die Substanzen A und B die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld zeigen, dass sie sich also nicht durch verschiedene Ladung unterscheiden.

---

[27] C.E. Dalgliesh, J. chem. Soc. 1952, 3940

[28] F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945)

[29] F. Turba, Chromat. Methoden i. d. Proteinchemie 176 (Berlin 1954)
H.G. Boman, Nature (London) 170, 703 (1952)

Die zur Elementaranalyse von A und B notwendige Substanzmenge wurde durch papierchromatographische Auftrennung von Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin gewonnen. Nach dem Eluieren konnten die getrennten Diastereomeren aus Ameisensäure umkristallisiert werden; das Gemisch zeigte keine Tendenz zur Kristallisation. Die Werte der Elementaranalyse von A und B stimmen überein, wie es für Diastereomere zu erwarten ist. Die I.R.-Spektren zeigen Unterschiede im Bereich von 2.7-6 $\mu$. Das U.V.-Absorptionsmaximum von A liegt bei 357 m$\mu$, das von B bei 360 m$\mu$.

## III. Die enzymatische Reaktion

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur enzymatischen Spaltung der 3-Hydroxy-anthranilsäure mit Hilfe von Leber-Extrakten unterscheiden sich im wesentlichen nur hinsichtlich der Substratkonzentration und der Reaktionstemperatur. Für das vorliegende Problem war zu ermitteln, welche der bekannten Methoden die höchste Anreicherung des bei 360 mμ absorbierenden Zwischenproduktes gestattet. Ausserdem war zu prüfen, ob bei 0°-Inkubationen andere Reaktionsprodukte gebildet werden als bei 26°- bzw. 37°-Inkubationen (wie es WISS [8] vermutete) und ob man die 3-Hydroxy-anthranilsäure nicht nur, wie üblich, in Pufferlösung, sondern auch in salzfreier Lösung enzymatisch spalten kann.

Für die folgenden Versuche wurde ein wässriger Extrakt des Aceton-Trockenpulvers von Schweineleber verwendet und eine Substratkonzentration von 50 mg/100 ccm gewählt. Die Bildung des Zwischenproduktes wurde in üblicher Weise spektrophotometrisch verfolgt.

Lässt man die enzymatische Reaktion bei 0° in Pufferlösung oder in salzfreier Lösung ablaufen, so steigt die Extinktion $_{366}$ stetig an, bis nach etwa zwei Stunden ein Maximalwert von 1 bis 1.5 E erreicht ist, wie es Abb. 2 zeigt. Die enzymatische Spaltung ist also in salzfreier Inkubationslösung ebenfalls möglich.

Inkubiert man in Pufferlösung bei 37° oder bei 26° anstatt bei 0°, so bleibt die bei 366 mμ gemessene optische Dichte der Inkubationslösung unterhalb von 0.5 E. Die zeitliche Veränderung der Extinktion $_{365}$, in Abb. 3 als Basalkurve eingezeichnet, erreicht ihren Scheitelpunkt nach etwa 15 bis 20 Minuten.

Lässt man die Messlösungen, die hundertfach verdünnter sind als die Inkubationslösung, bei Raumtemperatur stehen, so kann man ein rasches Ansteigen der Extinktion $_{366}$ beobachten. Die in Abb. 3 von den Messpunkten der Basalkurve a ausgehende Kurvenschar zeigt diesen eigenartigen Effekt, der bei 0°-Inkubationen kaum auftritt. Zur Deutung dieses Befundes kann man annehmen, dass bei 26° eine Substanz entsteht, die sich mit der 3-Hydroxy-anthranilsäure-Oxydase zu einem enzymatisch inaktiven Komplex verbindet. Durch das Verdünnen vor der Messung wird der Dissoziationsgrad des Komplexes erhöht und die Enzymaktivität wiederhergestellt.

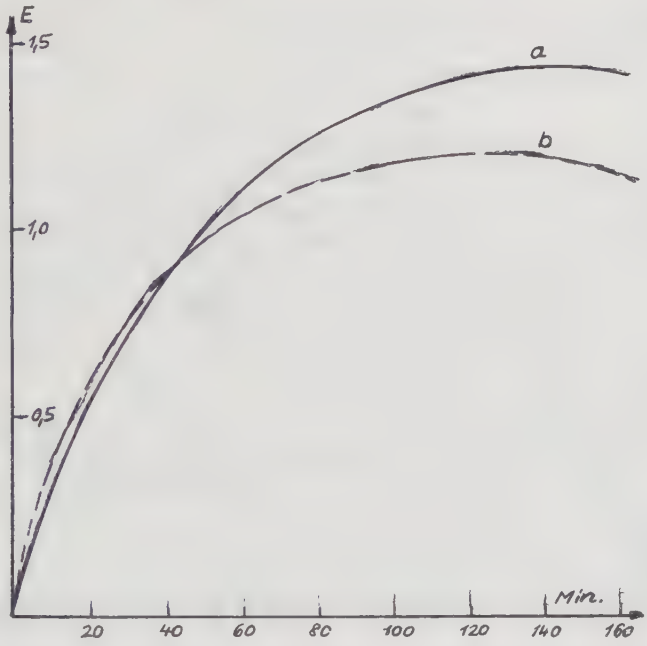



Abb. 2

0°-Inkubation. Zeitliche Veränderung der opt. Dichte bei 366 mμ.

Kurve a: 5 g Acetontrockenp. mit 100 ccm Phosphatpuffer $p_H$ 7.4 extrahiert. Diese Lösung bei 0° mit 50 mg 3-Hydroxy-anthranilsäure inkubiert. 0.05 ccm der Inkubationslösung zu verschiedenen Zeiten entnommen, mit Phosphatpuffer $p_H$ 7.4 auf 5 ccm aufgefüllt. Diese Messlösung bei 0° sofort im Eppendorf-Photometer bei 366 mμ gemessen.

Kurve b: 10 g Acetontrockenp. mit 100 ccm destilliertem Wasser extrahiert. Sonst Inkubation und Messmethode wie bei Kurve a.

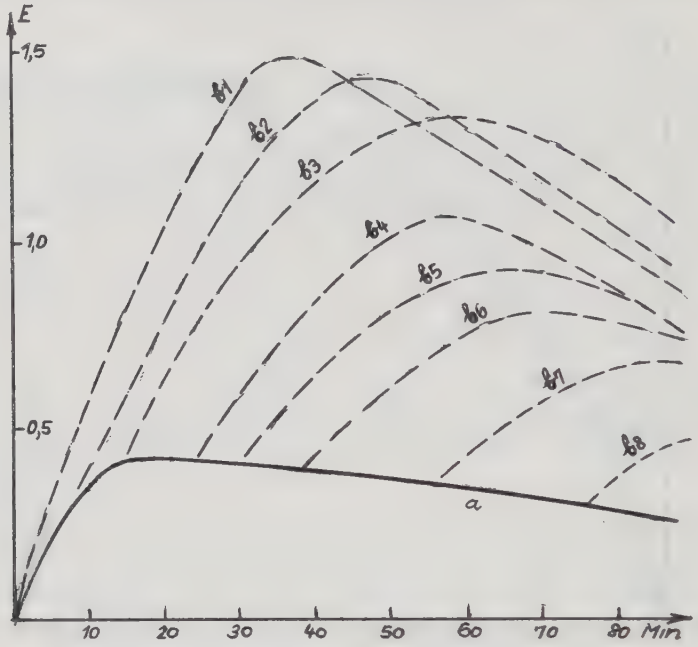



Abb. 3

26°-Inkubation. Zeitliche Veränderung der opt. Dichte bei 366 mμ.
Kurve a, Basalkurve; Inkubation bei 26°, sonst Ansatz und Messmethode wie bei Abb. 2 Kurve a.
Kurvenschar $b^1$, $b^2$, $b^3$...: Anstieg der Extinktion $_{366}$ der Messlösungen einer 26°-Inkubation. Erläuterung s. Text.

Obwohl bei 0°- bzw. 26°-Inkubationen die in Abb. 2 und 3 gezeigten Unterschiede auftraten, konnte doch nach beiden Versuchen, wie auch nach 37°-Inkubationen, das gleiche Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Absorptionsspektren der Messlösungen von 0°-, 26°- und 37°-Inkubationen zur Zeit maximaler Extinktion $_{366}$ gemessen. Die U. V. -Spektren waren identisch und zeigten die bekannten Maxima des Zwischenproduktes bei 360 mμ und 275 mμ [8]. Nach Erhitzen der Messlösung auf 100° war in allen drei Fällen Chinolinsäure, die sich in nicht enzymatischer Reaktion aus dem Zwischenprodukt bildet [12], spektrophotometrisch nachzuweisen.

Ausserdem zeigten Butanolextrakte von 0°-Inkubationen, deren Darstellung später besprochen wird, U.V.-Absorptionsmaxima bei 340 und 290 mμ. Das entspricht den Werten, die von HENDERSON et al [13] nach 37°-Inkubationen für alkoholische Lösungen des Zwischenproduktes ermittelt worden sind.

Nach diesen Befunden ist mit Sicherheit anzunehmen, dass im Bereich von 0 bis 37° die Struktur des Zwischenproduktes durch die Reaktionstemperatur nicht beeinflusst wird. Temperaturen über 0° bewirken aber - möglicherweise über die von WISS [8] erwähnte spontane Oxydation der 3-Hydroxy-anthranilsäure - bei gegebener Substratkonzentration eine reversible Hemmung der enzymatischen Reaktion, die durch entsprechende Verdünnung aufgehoben werden kann. Deswegen erreicht man mit Hilfe der von WISS [8] beschriebenen Methode der 0°-Inkubation eine etwa hundertfach höhere Konzentration des Zwischenproduktes.

Aus diesem Grunde wurden die folgenden Aufarbeitungen im Anschluss an 0°-Inkubationen durchgeführt. Die von WISS [8] angegebene Substratkonzentration wurde ebenfalls beibehalten. Es wurden aber, ausser bei den Versuchen, die ein direktes Nacharbeiten der von WISS et al. beschriebenen Experimente darstellten, die zur nachfolgenden Aufarbeitung benötigten Inkubationslösungen nicht mit Phosphatpuffer, sondern mit destilliertem Wasser angesetzt. Durch diese Modifikation wurde ein Salzgehalt der Lösung, der die spätere Aufarbeitung stören würde, vermieden.

## IV. Isolierung und Charakterisierung des Zwischenproduktes als 2.4-Dinitrophenylhydrazon

Nach SCHWEIGERT et al. [12] und HENDERSON et al. [13] wird die Struktur des Zwischenproduktes verändert, wenn man das Eiweiss der Inkubationslösung mit Schwermetallsalzen oder Säuren ausfällt. Die Autoren verwendeten deshalb Aceton oder Äthanol als Fällungsmittel. Diese Methoden sind für Versuche zur Isolierung des Zwischenproduktes nicht sehr geeignet, weil durch das Fällungsmittel (66% des Gesamtvolumens) die Lösung erheblich verdünnt wird. Es ist ausserdem unzweckmässig Aceton anzuwenden, wenn man das Zwischenprodukt mit Hilfe von Carbonylreagenzien identifizieren will.

WISS und BETTENDORF [14] fällten das Eiweiss der Inkubationslösung mit Trichloressigsäure bei 0° und setzten den Überstand in der Kälte mit einer Lösung von Dinitrophenylhydrazin in 2-N HCl um. Kontrolliert man die Extinktionen der Ansätze vor und nach dem Zusatz der Trichloressigsäure, so werden die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse erhalten.

Man erkennt, dass durch Zugabe der Trichloressigsäure bei 0° das Absorptionsmaximum von 360 mμ nach 375 mμ verschoben wird. Das lässt vermuten, dass bei diesem Experiment das gleiche denaturierte Zwischenprodukt entsteht, das SCHWEIGERT et al [12] durch Behandeln der 37°-Inkubation mit 20% Metaphosphorsäure erhalten haben.

Versetzt man eine mit Trichloressigsäure behandelte Inkubationslösung entsprechend der von WISS und BETTENDORF [14] angegebenen Methode mit salzsaurer Dinitrophenylhydrazin-Lösung, so entsteht ein roter Niederschlag, der ausbleibt, wenn man Blindproben (ohne 3-Hydroxy-anthranilsäure oder ohne Enzympräparat) in entsprechender Weise mit Dinitrophenylhydrazin behandelt. Der rote Niederschlag lässt sich durch Papierchromatographie in mehrere Komponenten auftrennen. Die Abb. 5 zeigt die schematische Darstellung eines solchen Chromatogrammes und die U.V.-Spektren der Banden 3 bis 5.

Wie man erkennt, zeigt keine der Substanzen eine Absorptionsbande um 420 mμ. In diesem Wellenlängenbereich sollte jedoch nach Tab. 1 das Absorptionsmaximum des Dinitrophenylhydrazons des Zwischenproduktes liegen.

Ohne Berücksichtigung der anderen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit würde dieser Befund keine eindeutige Aussage erlauben, denn es könnte das Spektrum des Dinitrophenylhydrazons des Zwischenproduktes bei niedriger Extinktion durch die U.V.-Absorption der Begleitsubstanzen überlagert sein. Ausserdem kann man eine Zersetzung des Dinitrophenylhydrazons im Laufe der Chromatographie bei 0° nicht ausschliessen. Deswegen wurde später nicht nur das Eluat der Chromatogramme, sondern auch das frisch gefällte Dinitrophenylhydrazon hydriert.

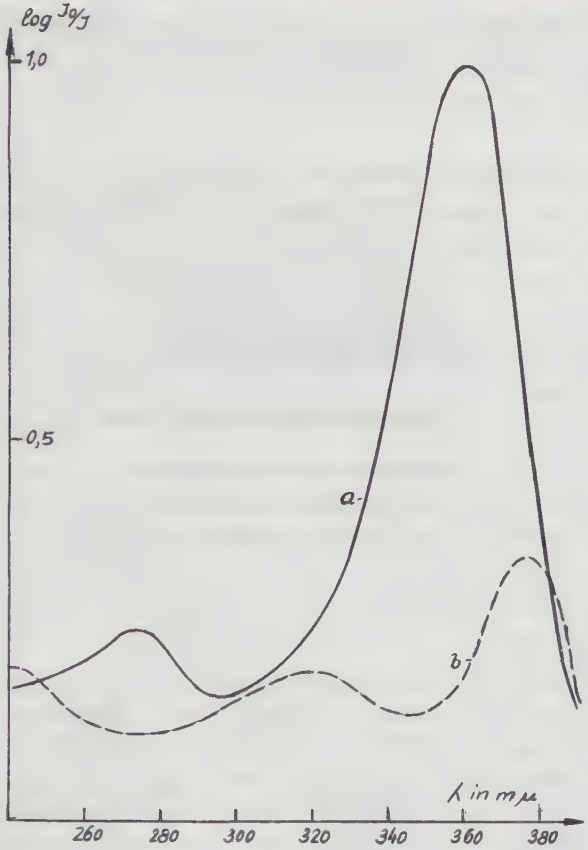



Abb. 4

U. V. -Spektren einer Inkubationslösung vor und nach Eiweissfällung mit Trichloressigsäure bei 0°. Ansatz wie Abb. 2 Kurve a.

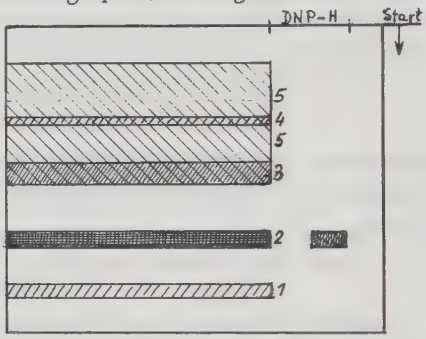
Kurve a: 0°-Inkubation. Z. Zt. maxim. Extinktion $_{366}$ 0.05 ccm entnommen, mit 1/60-M Phosphatpuffer $p_H$ 7.4 auf 5 ccm aufgefüllt und sofort in 20 mm Küvette im Zeiss-Spektrophotometer gemessen. Bezugslösung: gleicher Ansatz ohne 3-Hydroxy-anthranilsäure.

Kurve b: Gleiche Inkubationslösung nach Eiweissfällung mit 10 ccm 50 proz. Trichloressigsäure. Nach dem Zentrifugieren in der Kälte 0.05 ccm entnommen, sofort mit Pufferlösung verdünnt und gemessen wie Kurve a. Bezugslösung: gleicher Ansatz ohne 3-Hydroxy-anthranilsäure.

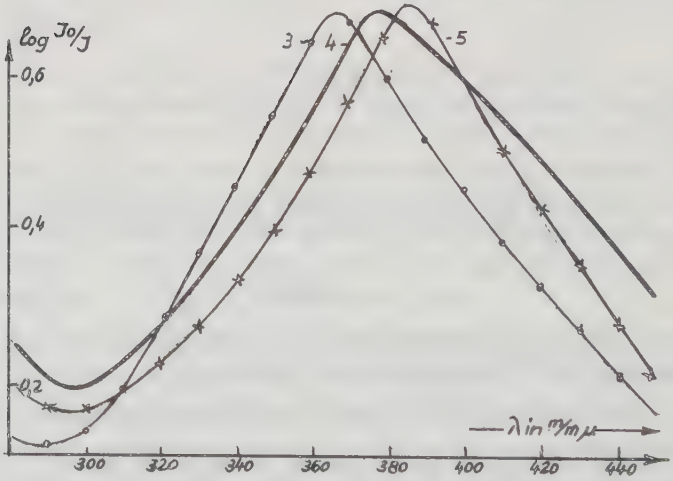
Abb. 5

Papierchromatographie und U. V. -Absorption des aus der Inkubationslösung in Gegenwart von Salzsäure bei 0° dargestellten Gemisches von Dinitrophenylhydrazonen.

Papierchromatographie, absteigend, auf SS 2043b




Butanol-Äthanol-Wasser




Inkubationslösung nach Eiweissfällung mit Trichloressigsäure (s. Abb. 4, Kurve b) mit 20 ccm einer gesättigten Lösung von Dinitrophenylhydrazin in 2-N HCl versetzt. Niederschlag nach Waschen mit eiskaltem Wasser zur Papierchromatographie neben Dinitrophenylhydrazin (DNP-H) als Referenz aufgetragen. Aufarbeitung und Chromatographie bei 0°.

Die weiteren Versuche zur Isolierung des Zwischenproduktes wurden unter milderen Bedingungen durchgeführt.

Die salzfreie Inkubationslösung wurde lyophilisiert und der Rückstand dialysiert. Das U. V. -Spektrum des Dialysates zeigte die typischen Absorptionsmaxima des Zwischenproduktes bei 360 und 275 mμ; 30% des Zwischenproduktes blieben erhalten.

Durch Digerieren des Rückstandes der Gefriertrocknung mit Methanol wurde eine alkoholische Lösung des Zwischenproduktes gewonnen. Die spektrophotometrische Ausbeutebestimmung zeigte, dass während der relativ langwierigen Gefriertrocknung 40-50% des Zwischenproduktes zersetzt worden war.

Die Abtrennung der Proteine der Inkubationslösung mit Hilfe der Phenol-Methode [30] ergab die in Abb. 6 dargestellten Ergebnisse. Man erkennt, dass durch die Behandlung mit Phenol die Struktur des Zwischenproduktes und seine Konzentration nicht verändert werden.

Für die folgende Reaktion, die durch $H^+$-Ionen katalysierte Umsetzung des säurelabilen Zwischenproduktes mit Dinitrophenylhydrazin wurde saurer Ionenaustauscher anstelle von freier Säure verwendet. Die Vorversuche zeigten, dass man eine Lösung des Zwischenproduktes in der Kälte mit Dowex 50 $H^+$ schütteln kann, ohne dass dadurch die spektralen Eigenschaften des Zwischenproduktes verändert werden.

Vor der Behandlung mit saurem Ionenaustauscher konnte das Zwischenprodukt nicht mit organischen Lösungsmitteln aus der eiweiss-freien Inkubationslösung extrahiert werden: beim Ausschütteln mit Butanol in Gegenwart von Dowex 50 $H^+$ färbte sich die organische Phase gelb, das anschliessend gemessene Absorptionsspektrum zeigte Maxima bei 340 und 290 mμ, wie es für alkoholische Lösungen des Zwischenproduktes zu erwarten war. Durch Extraktion mit Phosphatpuffer $p_H$ 7. 4 wurde die butanolische Lösung entfärbt, das Zwischenprodukt war anschliessend in der wässrigen Lösung nachzuweisen ($\lambda_{max}$ 360 mμ). Dasselbe Ergebnis wurde erhalten, wenn man vor der Butanol-Extraktion das Austauscherharz abfiltriert. Die Veränderung des Verteilungskoeffizienten ist auf das Absinken des $p_H$ Wertes der wässrigen Phase durch die Dowex-Behandlung zurückzuführen.

Modellversuche mit Sorbinal und Lävulinsäure liessen erkennen, dass Dinitrophenylhydrazone bei 0° in Gegenwart von Dowex 50 dargestellt werden können. In siedendem Alkohol führte die analoge Reaktion zusätzlich zu einer Veresterung der Lävulinsäure.

---

[30] H. Schuster et al., Z. Naturforschung 11 b, 339 (1956)

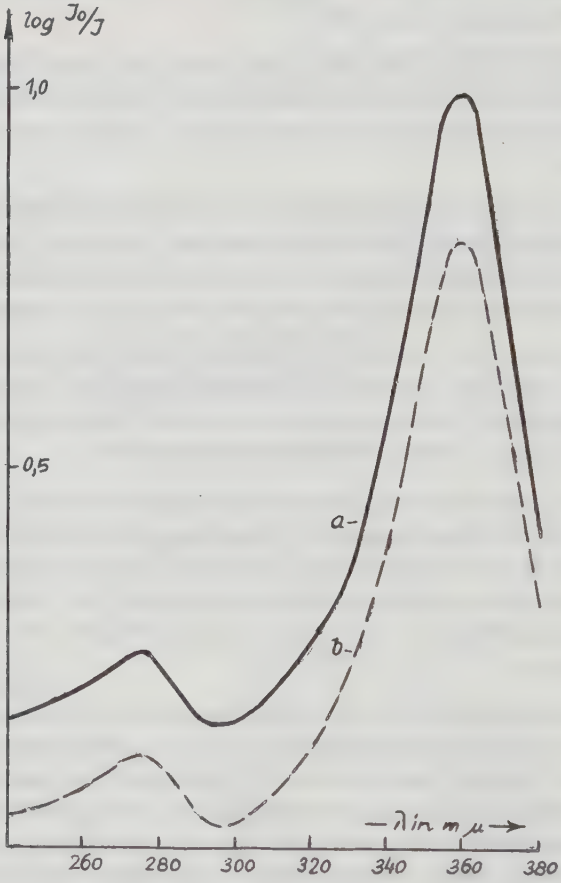



Abb. 6

U. V. -Spektren einer Inkubationslösung vor und nach Eiweiss-Abtrennung mit Hilfe der Phenol-Methode bei 0°. Ansatz wie Abb. 2, Kurve b.

Kurve a: salzfreie 0°-Inkubation. Probenahme, Verdünnung und Messung wie Abb. 4, Kurve a.

Kurve b: gleiche Inkubationslösung nach 10 Min. Schütteln mit 80 ccm 80 proz. Phenollösung, Zentrifugieren und Waschen der wässrigen Phase mit Äther. Probenahme, Verdünnung und Messung wie Abb. 4, Kurve b. Bezugslösung: gleicher Ansatz, ohne Zusatz von 3-Hydroxy-anthranilsäure.

Bei der Umsetzung des Zwischenproduktes mit Dinitrophenylhydrazin wurden die besten Ausbeuten erhalten, wenn man die wässrige Lösung der Phenol-Präparation mit einer butanolischen Dinitrophenylhydrazinlösung in Gegenwart von Dowex 50 schüttelte. Zur Kontrolle der Reaktionsgeschwindigkeit wurden Proben der butanolischen Phase der Reaktionslösung entnommen und ihre U. V. -Absorption im Zeiss-Spektrophotometer gegen eine butanolische Dinitrophenylhydrazin-Lösung gemessen.

Es war vorteilhafter, für die Messreihe eine einzige Bezugslösung zu verwenden, als für jede Einzelmessung die entsprechende Bezugslösung durch Blindversuch herzustellen.

In Abb. 7 A ist eine Auswahl der erhaltenen U. V. - Spektren dargestellt. Die Absorptionsbanden bei 450 mμ treten nur beim vollständigen System auf. In Abb. 7 B ist die beim gleichen Versuch ermittelte zeitliche Veränderung der optischen Dichte der butanolischen Phase bei 450 mμ eingetragen: Die Extinktion$_{450}$ steigt im Verlauf von zwei Stunden an und fällt dann wieder ab.

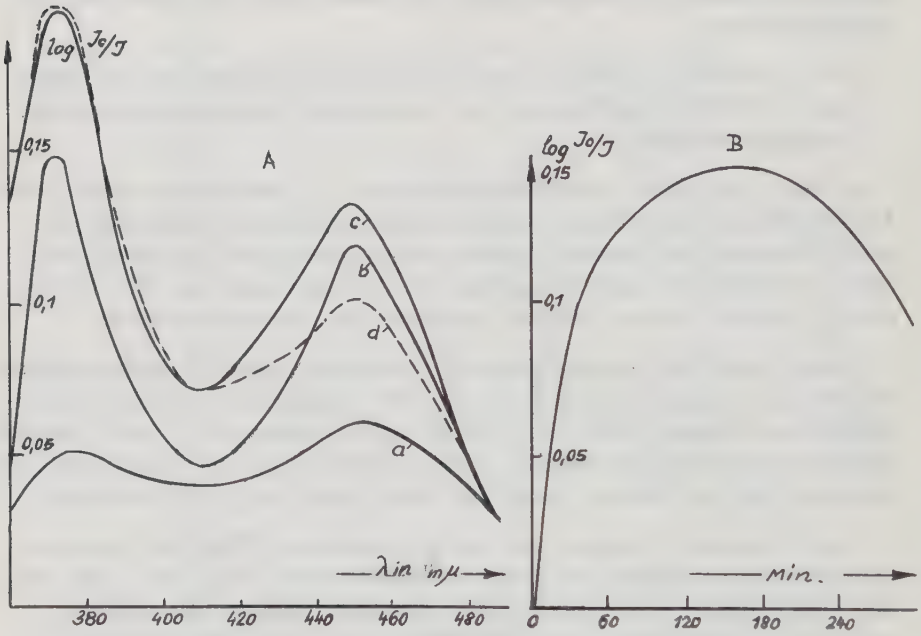
Unter Verwendung der oben genannten Bezugslösung konnte man die zeitliche Veränderung des Systems messen; die Lage des Absorptionsmaximums der neugebildeten Verbindung wurde mit Hilfe der dafür geeigneten, in Abb. 8 beschriebenen Versuchsanordnung bestimmt. Das Absorptionsmaximum des Dinitrophenylhydrazons liegt bei 425 mμ, also in dem nach Tab. 1 zu erwartenden Bereich.

Das Dinitrophenylhydrazon kann aus der butanolischen Phase des Reaktionsgemisches mit Petroläther ausgefällt werden. Die Kurve b der Abb. 8 stellt das U. V. -Spektrum einer methanolischen Lösung dieser gefällten Substanz dar. Durch Papierchromatographie des Niederschlages bei 0° wurde eine rote Bande erhalten, (Abb. 9, Bande 5). Die Kurve c der Abb. 8 zeigt das Absorptionsmaximum des methanolischen Eluates dieser Bande.

Wegen der bekannten Instabilität des Zwischenproduktes wurde nicht versucht, das Dinitrophenylhydrazon analysenrein darzustellen. Petroläther-Fällung und Papierchromatographie wurden durchgeführt, um das isolierte Dinitrophenylhydrazon spektrophotometrisch zu messen. Diese Messung (Abb. 8, Kurven b und c; Bezugslösung: Methanol) bestätigte, dass die in Abb. 8, Kurve a gezeigte U. V. -Absorption ($\lambda_{max}$ 425 mμ; Bezugslösung: durch Blindversuch hergestellt) als charakteristische Konstante der dargestellten Verbindung anzusehen ist. Zur Identifizierung wurde die butanolische Lösung des Dinitrophenylhydrazons (butanolische Phase des Reaktionsgemisches) oder der daraus durch Petroläther-Zusatz gewonnene Niederschlag katalytisch hydriert.

Abb. 7

Spektrophotometrische Kontrolle der Darstellung von Phenylhydrazon in Gegenwart saurer Ionenaustauscher.




A

Kurven a, b, c, d: Inkubation und Eiweiss-Abtrennung wie bei Abb. 5, Kurve b, wässrige Lösung des Zwischenproduktes anschliessend mit 5 g Dowex 50 x 2 (200-400 mesh) ($H^+$-Form) und 40 ccm eiskalter gesättigter Lösung von Dinitrophenylhydrazin in n-Butanol bei $0^o$ geschüttelt. Zur Aufnahme der U.V.-Spektren 0.05 ccm der butanolischen Phase mit Methanol auf 5 ccm aufgefüllt, in 20 mm Küvetten im Zeiss-Spektrophotometer gemessen. Bezugslösung: 0.05 ccm der butanolischen Dinitrophenylhydrazin-Lösung mit Methanol auf 5 ccm aufgefüllt.

a: Messung 3 Minuten nach Reaktionsbeginn
b: 60
c: 90
d: 270

B

Durch weitere Messungen im gleichen Versuch ermittelte zeitliche Veränderung der optischen Dichte bei 450 mμ der butanolischen Phase der Reaktionslösung.

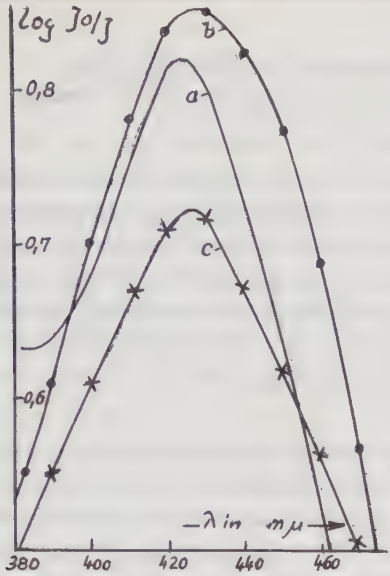



Abb. 8

U. V. -Spektren des Dinitrophenylhydrazons des Zwischenproduktes.

Kurve a: Messlösung wie Abb. 7, Kurve c. Bezugslösung: Inkubationslösung ohne 3-Hydroxy-anthranilsäure nach Phenolpräparation (Abb. 6, Kurve b) mit butanolischer Phenylhydrazinlösung in Gegenwart von Dowex 50 ( Abb. 7 A) behandelt. Nach 90 Minuten 0.05 ccm der butanolischen Phase mit Methanol auf 5 ccm aufgefüllt.

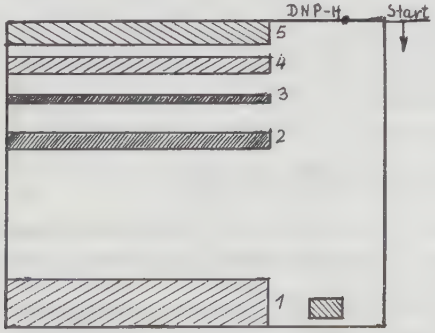
Kurve b: Petroläther-Fällung s. Text.

Kurve c: Papierchromatographie s. Text.

Abb. 9

Papierchromatographie der aus der Inkubationslösung in Gegenwart von saurem Ionenaustauscher dargestellten Dinitrophenylhydrazone.

Papierchromatographie, absteigend, auf SS 2043b




Butanol-Äthanol-Wasser

Butanolische Phase der bei Abb. 7 beschriebenen Reaktionslösung mit Petroläther versetzt. Niederschlag in wenig Methanol gelöst und zur Papierchromatographie neben Dinitrophenylhydrazin (DNP-H) als Referenz aufgetragen. Entwickelt bei 0°.

## V. Identifizierung des Zwischenproduktes durch Reduktion des Dinitrophenylhydrazons zu β-Carboxy-lysin

Im Abschnitt II dieser Arbeit wurde bereits die Spaltung einiger Dinitrophenylhydrazone zu den entsprechenden Aminosäuren durch katalytische Hydrierung in salzsaurer alkoholischer Lösung beschrieben. Beim Hydrieren des Dinitrophenylhydrazons des Zwischenproduktes wurde wegen der Empfindlichkeit dieser Substanz gegen Säuren die reduktive Spaltung der N-N-Bindung erst dann durch Salzsäurezusatz erleichtert, wenn die C-C-Doppelbindungen bereits hydriert waren. Die entsprechenden Versuchsbedingungen wurden mit Hilfe einer Modellreaktion ausgearbeitet.

Sorbinal -ein Dien-al mit konjugierten Doppelbindungen wie das Zwischenprodukt- wurde durch Oxydation von Sorbinol gewonnen und als Semicarbazon identifiziert [31]. Zur Oxydation wurde ein nach ATTENBURROW aktiviertes [32] Braunsteinpräparat verwendet. Das bisher nicht beschriebene Dinitrophenylhydrazon wurde auf dem üblichen Wege dargestellt. In methanolischer Lösung wurde katalytisch (Pt) bis zur Entfärbung hydriert, dann kurz unterbrochen um Salzsäure zusetzen zu können. 50-70% des eingesetzten Sorbinal-dinitrophenylhydrazons wurden zum erwarteten n-Hexylamin reduziert, das als Pikrolonat identifiziert wurde.

Nach Reduktion der Dinitrophenylhydrazone (s. S. 16 u. S. 21 ) enzymatischer Ansätze, unter den im Modellversuch ermittelten Bedingungen, wurden Lactame oder Ester, die während der Hydrierung entstehen können, verseift. Anschliessende Papierchromatographie zeigte, dass das Hydrolysat zahlreiche farbige und ninhydrin-positive Komponenten (z. B. Reduktionsprodukte von Dinitrophenylhydrazin, Triaminobenzol und Produkte der Autoxydation) enthält, die eine Identifizierung der entstandenen Aminosäuren erschweren.

Zur Fraktionierung des Gemisches wurde:

1) Das Hydrolysat mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt und die ätherlöslichen sauren DNP-Derivate in der üblichen Weise isoliert und papierchromatographisch auf Bis-DNP-β-Carboxy-lysin geprüft.

2) Das Hydrolysat papierchromatographisch von Nebenprodukten des zu erwartenden β-Carboxy-lysins befreit. Die Substanzen mit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit wie das synthetisierte β-Carboxy-lysin wurden eluiert. Ein Teil des Eluates wurde zur Identifizierung der Aminosäuren rechromatographiert,

---

[31] R. Kuhn, Chem. Ber. 63, 2164 (1930)

[32] J. Attenburrow et al., J. chem. Soc. 1952, 1094

der andere Teil mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt und wie bei 1) chromatographiert, um Anschluss an die nach 1) erzielten Ergebnisse zu gewinnen.

Das nach Eiweissfällung mit Trichloressigsäure und Umsetzen mit salzsaurer Dinitrophenylhydrazin-Lösung aus enzymatischem Ansatz gewonnene Dinitrophenylhydrazon (s. S. 16) wurde nach der oben beschriebenen Methode reduziert und chromatographiert. Es war kein $\beta$-Carboxy-lysin nachzuweisen. Der Befund zeigt, dass nach dieser von WISS und BETTENDORF [14] angegebenen Methode nicht das Dinitrophenylhydrazon des $\alpha$-Amino-$\beta$-carboxy-muconsäure-halbaldehyds-($\omega$) (VI) isoliert wird.

Das aus salzfreier Inkubationslösung nach Abtrennen des Eiweisses -durch Phenolpräparation oder Dialyse bzw. Methanolextraktion nach Gefriertrocknung - durch Umsetzen mit Dinitrophenylhydrazin in Gegenwart von saurem Ionenaustauscher gewonnene Dinitrophenylhydrazon (s. S. 21) wurde ebenfalls reduzierend gespalten und chromatographiert,wie oben beschrieben. Die Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Papierchromatographie der DNP-Derivate.

Die Chromatogramme beweisen, dass die Banden $Y_1$ und $Y_2$ die mit den Diastereomeren $\beta$-Carboxy-lysin Derivaten A und B papierchromatographisch identischen Substanzen enthalten. Erwartungsgemäss unterscheiden sich die bei X (Versuch ohne Dinitrophenylhydrazin-Zusatz) und Y (vollständiges System) aufgetragenen Substanzen nur hinsichtlich des Auftretens dieser Verbindungen.

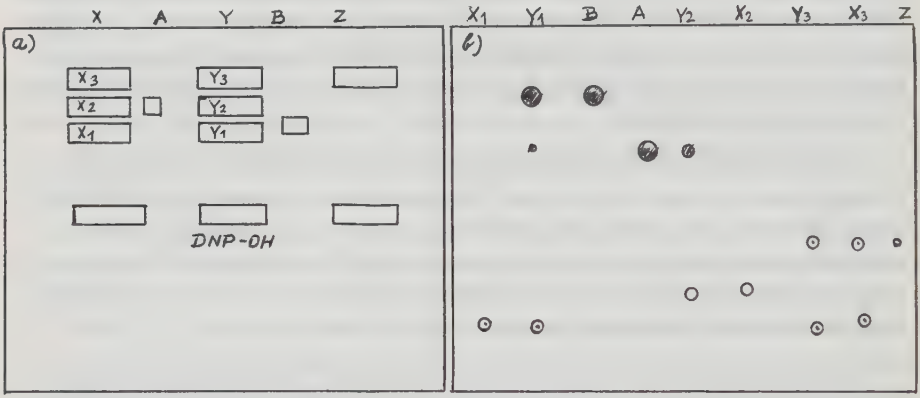
Die Papierchromatographie des nach Methode 2 (Seite 24) gewonnenen Gemisches von Aminosäuren bestätigte ebenfalls das Vorliegen von $\beta$-Carboxy-lysin in der hydrierten Lösung. Die freie Diamino-dicarbonsäure wurde in zwei Systemen papierchromatographisch identifiziert. Die Umsetzung des Eluates mit Dinitrofluorbenzol führte wiederum zu DNP-Derivaten mit den für Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin A und B charakteristischen Eigenschaften.

Erwartungsgemäss stimmen die papierchromatographisch identischen Substanzen auch hinsichtlich ihrer U. V. -Absorption völlig überein
($Y_2$) Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin A: $\lambda_{max}$ 357 mμ.
($Y_1$) Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin B: $\lambda_{max}$ 360 mμ.

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die durch ein Absorptionsmaximum bei 425 mμ (Abb. 8) charakterisierte Verbindung das Dinitrophenylhydrazon des $\alpha$-Amino-$\beta$-carboxy-muconsäure-halbaldehyds-($\omega$) darstellt, während die von WISS et al. [14] isolierte Substanz als Dinitrophenylhydrazon eines Zersetzungsproduktes unbekannter Struktur anzusehen ist. Damit ist die von BONNER und YANOFSKY [5] 1949 postulierte Struktur des Zwischenproduktes erstmalig bewiesen.

Abb. 10

Chromatographie von DNP-Derivaten zur Identifizierung des Zwischenproduktes, absteigend, auf SS 2043b.




Butanol-Ammoniak 1,5-M Phosphatpuffer $p_H$ 6

A und B, die im Abschnitt II beschriebenen Diastereomeren des Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysins, wurden als Referenzsubstanzen aufgetragen.

a)

Bei Y wurde das Gemisch der DNP-Aminosäuren, aufgetragen, das nach dem im Text beschriebenen Verfahren erhalten wird. Beim Entwickeln des Chromatogrammes trennen sich die Banden $Y_1$, $Y_2$, $Y_3$ vom Dinitrophenol (DNP-OH) ab. Die bei X aufgetragene Substanz ist ein Gemisch von DNP-Aminosäuren aus einem Versuch, der sich nur dadurch vom Ansatz für Y unterscheidet, dass das Dinitrophenylhydrazon weggelassen wurde, dass also das enzymatisch gebildete Zwischenprodukt als solches reduziert wurde. Im Chromatogramm sind die Banden $X_1$, $X_2$, $X_3$ neben DNP-OH zu erkennen.

Die bei Z aufgetragene Substanz wurde bei einem Blindversuch isoliert, bei dem gegenüber dem Ansatz für Y die 3-Hydroxy-anthranilsäure, das Substrat der enzymatischen Reaktion, weggelassen wurde.

b)

Das Bild zeigt das Ergebnis der Rechromatographie der unter a genannten Substanzen.

Es wurde gezeigt, dass die 3-Hydroxy-anthranilsäure enzymatisch zum $\alpha$-Amino-$\beta$-carboxy-muconsäure-halbaldehyd oxydiert wird, da diese Verbindung nach dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verfahren zum Dinitrophenylhydrazon umgesetzt und zu der entsprechenden Aminosäure $\beta$-Carboxy-lysin hydriert werden konnte.

## B. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE [+)]

[+)] Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert und durch Erhitzen im offenen Röhrchen bestimmt.
Die Analysen wurden von der Firma Dr. Schöller, Kronach, oder von der Firma Bernhardt, Mühlheim, durchgeführt.

Darstellung von Piperidon-(2) (VIII) durch Schmidtsche-Reaktion.

In einem Dreihalskolben, der mit Gasableitungsrohr, KPG-Rührer und Tropftrichter versehen ist, wird eine Lösung von 42 g (0.5 M) Cyclopentanon und etwa 0.6 Mol Stickstoffwassersäure [33] in 350 ccm Chloroform eingebracht. Die Mischung wird gekühlt und unter Rühren im Eisbad tropfenweise mit 50 ccm konz. Schwefelsäure versetzt. Die Tropfenfolge wird so eingestellt, dass die Temperatur der Lösung nicht über 10° ansteigt.

Nach Beendigung der Reaktion wird mit 30 proz. Natronlauge unter Eiskühlung so langsam neutralisiert, dass die Temperatur bei 5-8° gehalten wird. Das ausgefallene Natriumsulfat wird abfiltriert. Die wässrige Phase des Filtrates und das Natriumsulfat werden je sechsmal mit Chloroform gewaschen, die Chloroformextrakte vereinigt und auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird im Vakuum destilliert.
Piperidon-(2) $Sdp._{14}$ 137°, Ausbeute 38 g 77% d. Th.

Versuche zur Halogenierung von δ-Benzamino-valeriansäure.

1) Bromierungen mit Brom und rotem Phosphor wurden unter den üblichen Bedingungen durchgeführt. Die bromierte Säure wurde mit Natriumbicarbonatlösung aufgenommen, im Rückstand verblieb α,α-Dibrom-piperidon-(2). Beim Ansäuern der Natriumbicarbonatlösung fiel die bromierte Säure als rotes Öl aus, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. (Vgl. übereinstimmende Ergebnisse [23], [34], [35].)

2) Chlorierungen mit Sulfurylchlorid und Jod wurden in Analogie zur Chlorierung von ε-Benzamino-capronsäure nach GALAT [36] durchgeführt. Es konnte keine kristallisierte α-Chlor-δ-benzamino-valeriansäure erhalten werden. Nach GALAT kristallisiert ein kleiner Teil der α-Chlor-ω-benzamino-carbonsäure aus dem Waschwasser aus; bei der Chlorierung von δ-Benzamino-valeriansäure wurden die aus dem Waschwasser zu isolierenden Kristalle jedoch als Benzoesäure identifiziert.

3) Bromierung mit Brom und rotem Phosphor und anschliessende Alkoholyse mit Methanol [37] führte nicht zu einem destillierbaren α-Brom-δ-benzamino-valeriansäure-methylester. Auch nach Umfällen konnte kein definiertes Reaktionsprodukt isoliert werden.

[33] Org. React. III 327 (New York 1947)
[34] E. Fischer u. G. Zemplen, Chem. Ber. 42, 1022 (1909)
[35] L. E. Schniepp u. C. S. Marvel, J. Am. chem. Soc. 57, 1557 (1935)
[36] A. Galat, J. Am. chem. Soc. 69, 86 (1947)

4) Eine Bromierung mit Brom und Thionylchlorid und anschliessende Alkoholyse [38] wurde ohne Erfolg versucht.

5) Die Chlorierung mit Sulfurylchlorid und Thionylchlorid mit anschliessender Alkoholyse führte zu einer braunroten zähflüssigen Substanz, die nicht nur Kristallisation zu bringen war und auch nicht destilliert werden konnte.

Darstellung von α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-methylester (XIII).

In eine Aufschlämmung von 12.3 g (0.05 Mol) δ-Phthalimido-valeriansäure und 1 g rotem Phosphor in 40 ccm Tetrachlorkohlenstoff werden 10 ccm Brom tropfenweise so zugegeben, dass die Reaktionsmischung immer in leichtem Sieden bleibt. Wenn alles Brom zugetropft ist, wird das Reaktionsgemisch noch 4 Stunden gekocht, dann unter Feuchtigkeitsausschluss im Vakuum eingedampft und der Rückstand unter Eiskühlung mit 50 ccm Methanol aufgenommen. Die Lösung wird erhitzt und 15 Minuten bei Siedetemperatur belassen, dann wird das Methanol abgedampft und der Rückstand mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wird dreimal mit Natriumbicarbonatlösung, zweimal mit Natriumbisulfitlösung und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Der nach dem Abdampfen des Äthers verbleibende Rückstand wird in wenig heissem Methanol gelöst. Beim Abkühlen scheidet sich der Ester kristallin ab.
Schmp. 55-56°, Ausbeute 15 g 88% d. Th.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $C_{14}H_{14}BrNO_4$ (340.1) | Ber. | C 49.43; | H 4.15; | Br 23.49; | N 4.12; |
| | Gef. | C 49.36; | H 4.25; | Br 23.52; | N 3.95; |

Darstellung von δ-Benzamino-valeriansäure-methylester und δ-Phthalimido-valeriansäure-methylester (XII) u. (XIIa).

Die entsprechenden Säuren werden in der üblichen Weise mit Diazomethan behandelt oder es werden 0.1 Mol der Acyl-aminosäure mit 50 ccm Methanol und 2.5 ccm konz. Schwefelsäure 3 Stunden unter Rückfluss gekocht und nach dem Abkühlen in 100 ccm 10 proz. Natriumcarbonatlösung gegossen. Der Ester erstarrt nach einiger Zeit.

Der δ-Benzamino-valeriansäure-methylester wird im Vakuum destilliert, $Sdp_4$ 217°, Schmp. 40-41°. Ausbeute 80% d. Th.

Der δ-Phthalimido-valeriansäure-methylester wird aus Methanol umkristallisiert. Schmp. 43°. Ausbeute 80% d. Th.

[37] B. C. Saunders u. G. Stacey, J. chem. Soc. 1948, 1773

[38] A. J. Vogel, J. chem. Soc. 1948, 644

Darstellung des N-Benzoyl-3-methoxalyl-piperidon-(2) (XIV) und des entsprechenden 2. 4-Dinitrophenylhydrazons (XVII).

2 g (0. 01 Mol) N-Benzoylpiperidon-(2) und 2. 4g (0. 02 Mol) Oxalsäure-dimethylester werden in 5 ccm Toluol gelöst und mit 0. 5 g (0. 02 Mol) Natriumhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wird unter Ausschluss von Feuchtigkeit 2 Stunden bei Siedetemperatur gehalten. Anschliessend wird das Reaktionsgemisch abgekühlt, die Natriumverbindung mit Eisessig zersetzt und das Gemisch mit Wasser und Äther aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge werden mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Aus dem mit heissem Methanol aufgenommenen Rückstand kristallisiert beim Abkühlen das N-Benzoyl-3-methoxalyl-piperidon-(2) aus. Es wird aus Äthanol oder Cyclohexan umkristallisiert. Die reine Substanz kristallisiert in langen igelförmig vereinigten weissen Nadeln.
Schmp. 113°. Ausbeute 470 mg, 16% d. Th.

$C_{15}H_{15}NO_5$ (289. 3) Ber. C 62. 29; H 5. 23; N 4. 85
Gef. C 62. 53; H 5. 35; N 4. 71

100 mg (0. 34 mMol) des Ketoesters werden in 2 ccm warmem Methanol gelöst und mit 10 ccm einer salzsauren methanolischen Lösung (9. 9 ccm Methanol, 0. 1 ccm konz. Salzsäure) von 0. 1 g Dinitrophenylhydrazin verrührt. Das Dinitrophenylhydrazon scheidet sich in Form von feinen gelben Nädelchen ab. Es wird aus Eisessig oder Äthanol umkristallisiert.
Schmp. 205-208° (Zers. ) Ausbeute 110 mg, 70% d. Th.

$C_{21}H_{19}N_5O_8$ (469. 4) Ber. C 53. 71; H 4. 08; N 14. 91
Gef. C 53. 53; H 4. 22; N 14. 84

Darstellung des Phenylhydrazons (XVIII a) und des 2. 4-Dinitrophenylhydrazons (XVIII b) von δ-Benzamino-α-methoxalyl-valeriansäuremethylester (XV a).

Zu einer Lösung von 5. 9 g (0. 05 Mol) Oxalsäure-dimethylester in 200 ccm Methanol wird 0. 11 g (0. 05 Mol) Natrium zugegeben. 11. 8 g (0. 05 Mol) δ-Benzamino-valeriansäure-methylester werden zugefügt und der Reaktionsansatz an eine Vakuumdestillationsapparatur, die gegen Luftfeuchtigkeit gesichert ist, angeschlossen. Bei einer Badtemperatur von 60-65° und einem Druck von 30 mm wird das Methanol langsam aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert, der Rest bei 4 mm Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 200 ccm Wasser aufgenommen, filtriert und zweimal mit Äther gewaschen. Beim Ansäuern der alkalischen wässrigen Lösung mit 8-N Schwefelsäure fällt der Ketoester ölig aus. Er wird mit Äther aufgenommen; die ätherische Lösung wird mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen bleiben 6 g eines hellgelben Öles zurück, das nicht kristallisierte.

a) 1 g des Rohproduktes werden zu einer salzsauren methanolischen Lösung (99ccm Methanol, 1 ccm Salzsäure konz.) von 1 g 2.4-Dinitrophenylhydrazin gegeben. Bei Zimmertemperatur kristallisiert nach einigen Tagen das Dinitrophenylhydrazon in Form kleiner gelber Nädelchen aus. Es wird aus Methanol umkristallisiert.

Schmp. 155° Ausbeute 1.2 g 30% d. Th. (bezogen auf XII a)

$C_{22}H_{23}N_5O_9$ (501.2) Ber. C 52.69; H 4.63; N 13.98

Gef. C 52.48; H 4.68; N 14.27

b) 1 g des Kondensationsproduktes wird mit 1 g Phenylhydrazin in 20 ccm Äther gelöst, nach 3-5 Stunden wird der Äther auf dem Wasserbad abgedampft und der Rückstand aus Methanol oder Methyl-butyl-äther umkristallisiert.

Schmp. 119°. Ausbeute 0.94 g. 28% d. Th. (bezogen auf XII a)

$C_{22}H_{25}N_3O_5$ (411.4) Ber. N 10.21

Gef. N 9.99

Darstellung des δ-Phthalimido-α-methoxalyl-valeriansäuremethylesters (XV) und des entsprechenden Dinitrophenylhydrazons (XVIII).

Ein Gemisch von 2.6 g (0.01 Mol) δ-Phthalimido-valeriansäuremethylester und 2.4 g (0.02 Mol) Oxalsäure-dimethylester wird in 10 ccm Benzol gelöst und mit 0.5 g (0.02 Mol) Natriumhydrid versetzt. Das Gemisch wird am Rückflusskühler (Calciumchlorid-Rohr.) 8 Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen wird die Natriumverbindung mit 5 ccm Eisessig zersetzt, das Natriumazetat mit Wasser gelöst und der Ketoester mit Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wird unter vermindertem Druck eingedampft und der Rückstand mit wenig Äthanol aufgenommen. Beim Stehen im Eisschrank setzt die Kristallisation ein, es wird aus Äthanol umkristallisiert.

Schmp. 104-107°, Ausbeute 1.5 g 40% d. Th.

$C_{17}H_{17}NO_7$ (347.3) Ber. C 58.78; H 4.94; N 4.04

Gef. C 58.85; H 5.01; N 4.09

Das Rohprodukt der Oxalesterkondensation wird in 5 ccm Methanol gelöst und die warme Lösung zu einer Lösung von 2 g 2.4-Dinitrophenylhydrazin in 200 ccm Methanol und 2 ccm konz. Salzsäure gegeben. Beim Stehen bei Zimmertemperatur scheiden sich die gelben Nadeln des Dinitrophenylhydrazons ab. Es wird aus Äthanol oder Eisessig umkristallisiert.

Schmp. 200° Ausbeute 2.6 g 50% d. Th. (bezogen auf XII)

$C_{23}H_{21}N_5O_{10}$ (527.3) Ber. C 52.39; H 4.02; N 13.29

Gef. C 52.64; H 3.99; N 13.07

Modellreaktion zur Sörensen-Kondensation.
Darstellung von ε-Phthalimido-α, β-dicarbomethoxy-capronsäure-methylester.

Zu einer Lösung von 0.11 g (0.005 Mol) Natrium und 0.66 g Malonsäure-dimethylester in 5 ccm Methanol werden 1.7 g (0.005 Mol) α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-methylester gegeben. Das Reaktionsgemisch wird zwei Stunden unter Feuchtigkeitsausschluss am Rückflusskühler gekocht. Das Methanol wird abgedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und mit Äther extrahiert. Nach dem Eindampfen des Ätherauszuges bleibt ein Rückstand, der aus Methanol kristallisiert.

Schmp. 83° Ausbeute 0.87 g 43% d. Th.

$C_{19}H_{21}NO_8$ (391.4) Ber. C 58.30; H 5.41; N 3.58
Gef. C 58.06; H 5.51; N 3.52

Modellreaktion zur Sörensen-Kondensation.
Darstellung von α-Formamino-α, β-dicarbomethoxy-valeriansäure-methylester.

0.74 g (0.033 Mol) Natrium und 5.8 g (0.033 Mol) Formaminomalonsäure-dimethylester werden in 30 ccm Methanol gelöst. 6.5 g (0.033 Mol) α-Brom-buttersäure-äthylester werden zugefügt und die Reaktionsmischung unter dem Rückflusskühler (Calciumchlorid-Rohr!) 12 Stunden gekocht. Das Methanol wird abdestilliert, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und die wässrige Aufschlämmung fünfmal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge werden eingedampft, der Rückstand wird aus Cyclohexan umkristallisiert.

Schmp. 102° Ausbeute 2.4 g 26% d. Th.

$C_{11}H_{17}NO_7$ (275.3) Ber. C 48.00; H 6.23; N 5.09
Gef. C 48.20; H 6.37; N 5.25

Darstellung des $N^{\alpha}$-Formyl-$N^{\varepsilon}$-phthalyl-α, β-dicarbomethoxy-lysin-methylesters(XVI).

5.1 g (0.015 Mol) α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-methylester und 1.75 g (0.01 Mol) Formaminomalonsäure-dimethylester werden in die Vorlage einer Destillationsapparatur gegeben. In diese Vorlage werden unter Ausschluss von Feuchtigkeit 8 ccm Methanol aus einem Kolben, in dem sich Magnesium-methylat und Methanol befinden, destilliert. Dann wird die Vorlage unter einen Rückflusskühler (Calciumchloridrohr!) gebracht und die Kondensation mit 0.23 g (0.01 Mol) Natrium in Gang gesetzt. Nach zwölfstündigem Kochen reagiert die Lösung neutral. Das Methanol wird abgedampft, der Rückstand mit Eiswasser versetzt. Das sich abscheidende Öl kristallisiert nach 2 Tagen beim Stehen im

Eisschrank. Es wird abfiltriert und der Rückstand mit kaltem Aceton digeriert, wobei eine Substanz zurückbleibt, die bei 214° schmilzt und bei 4 mm Druck bei 140-160° sublimiert. Aus Methanol kristallisiert sie in derben Prismen.
Ausbeute 0.26 g
Gef. C 61.84; H 5.80; N 5.08; Mol.Gew. 305
Diese Substanz wurde nicht weiter identifiziert.
Der gesuchte Methylester befindet sich in der Acetonlösung; das Aceton wird abgedampft und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert:
Schmp. 153-155° Ausbeute 1.5 g 35% d. Th.
$C_{20}H_{22}N_2O_9$ (434.4) Ber. C 55.29; H 5.11; N 6.46
Gef. C 55.21; H 5.34; N 6.47

Versuche zur Reduktion der Phenylhydrazone.

a) δ-Benzamino-α-methoxalyl-valeriansäure-methylester-dinitrophenylhydrazon (XVIII b) wurde in Methanol aufgeschlämmt und mit Platinkatalysator im Autoklav bei 10 at 15 Stdn. hydriert. Es entstand eine gelbe Lösung, die sich an der Luft braunrot färbte. Ein definiertes Produkt konnte nicht isoliert werden, auch nicht nach der Verseifung und Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol.

b) δ-Benzamino-α-methoxalyl-valeriansäure-methylester-phenylhydrazon (XVIII a) wurde mit Methanol aufgeschlämmt, mit amalgamierten Aluminiumspänen und successive mit Wasser versetzt. -Es konnte kein definiertes Produkt erhalten werden, auch nicht nach Verseifung und anschliessender Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol.

c) Wie unter b), doch wurde die Umsetzung bei 40-50° durchgeführt.

d) Wie unter b), aber die Umsetzung wurde in feuchtem Äther durchgeführt.

e) Oxalessigester-phenylhydrazon wurde unter Rühren in eine Suspension von Zinkstaub in Eisessig-Essigsäureanhydrid bei 20-25° eingebracht. Es wurde 1-Phenyl-pyrazolon-(5)-3-carbonsäure-äthylester isoliert und durch Schmelzpunkt und IR-Spektrum identifiziert.

f) Wie unter a), b), c) und d), aber mit Oxalessigester-Dinitrophenylhydrazon durchgeführt. Asparaginsäure konnte nicht isoliert werden.

g) Wie unter b), c) und d) aber mit Oxalessigester-phenylhydrazon und amalgamiertem Aluminiumgriess.

h) Wie unter g), aber mit amalgamierten Aluminium-Ringen.

i) Mit Natriumamalgam in Äthanol. Keine Asparaginsäure.

j) Mit Platinkatalysator in Eisessig wurde versucht, Oxalessigester-phenylhydrazon zu hydrieren, isoliert wurde nur das Pyrazolonderivat, das durch Schmelzpunkt und IR-Spektrum charakterisiert wurde.

k) Wie j), aber in Methanol, ebenfalls erfolglos.

Säulenchromatographie von Oxalessigester-phenylhydrazon. Darstellung von 1-Phenyl-pyrazolon-(5)-3-carbonsäure-äthylester.

100 mg Oxalessigester-phenylhydrazon werden in Benzol gelöst und auf eine mit Petroläther eingeschlämmte Säule von 5 g Aluminiumoxyd „Woelm", neutral, Aktiv. IV-V gegeben. Mit Chloroform werden 64 mg des Pyrazolonderivates eluiert, das durch Schmelzpunkt und IR-Spektrum identifiziert wurde.

Reduktion der Phenylhydrazone und Verseifung zu $\beta$-Carboxy-lysin (VII) bzw. Asparaginsäure.

10 mg Platinkatalysator wird in einem Gemisch von 10 ccm Methanol und 1 ccm konz. Salzsäure in einer Schüttelente vorhydriert.

a) 30-60 mg von XVIII a oder XVIII b bzw. Oxalessigester-phenylhydrazon oder -dinitrophenylhydrazon werden in diesem Gemisch aufgeschlämmt und unter Schütteln so lange hydriert, bis kein Wasserstoff mehr aufgenommen wird.

b) 30-60 mg XVII oder XVIII werden in dem oben genannten Gemisch, dem zur Lösungsvermittelung noch 5 ccm Eisessig zuzusetzen ist, aufgeschlämmt und so lange geschüttelt, bis kein Wasserstoff mehr aufgenommen wird.

Die Hydrierungsprodukte werden im Vakuum eingedampft und durch sechsstündiges Kochen mit 10 ccm konz. Salzsäure verseift. Nach dem Abkühlen wird filtriert und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand enthält das Hydrochlorid des $\beta$-Carboxy-lysins bzw. der Asparaginsäure.

Verseifung und Decarboxylierung von $N^{\alpha}$-Formyl-$N^{\varepsilon}$-phthalyl-$\alpha,\beta$-dicarbomethoxy-lysin-methylester (XVI) zum $\beta$-Carboxy-lysin. (VII)

220 mg (0.5 mMol) des Tricarbonsäureesters (XVI) werden mit 10 ccm konz. Salzsäure 12 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Zur Abtrennung der Phthalsäure, die sich praktisch quantitativ abscheidet, wird die Lösung auf $0^{\circ}$ abgekühlt und filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingedampft. Es bleiben 130 mg einer farblosen sehr hygroskopischen Substanz zurück, die einer quantitativen Ausbeute von $\beta$-Carboxy-lysin entsprechen und im chromatographischen

Test einen einzigen ninhydrinaktiven Fleck liefern. Kürzere Verseifungszeiten führen zu mehreren ninhydrinpositiven Flecken; beim Verseifen mit Bromwasserstoffsäure und Eisessig werden braune Nebenprodukte erhalten.

Darstellung von Bis-DNP-$\beta$-Carboxy-lysin und Trennung der Diastereomeren.

Das durch Decarboxylieren von 0.5 mM Tricarbonsäureester XVI entstandene $\beta$-Carboxy-lysin wird im Autotitrator bei 50° mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt. Die Auswertung der Titrationskurve ermöglicht eine quantitative Bestimmung der eingesetzten Aminosäure. Ausbeute: 85% d.Th. (bezogen auf XVI).

Nach Beendigung der Reaktion wird wie üblich aufgearbeitet, der Essigesterextrakt wird im Vakuum bis auf 2 ccm eingeengt und in einem 6 cm breiten Streifen auf einen Chromatographiebogen SS 2043 b aufgetragen. Es wird mit Butanol-Ammoniak nach der Methode der absteigenden Chromatographie entwickelt. Dinitrophenol, Dinitroanilin und geringe Mengen anderer Verunreinigungen trennen sich ab. Nach 24stündiger Laufzeit wird die obere Bande mit 1 proz. Natriumbicarbonatlösung eluiert. Die Lösung wird mit Salzsäure angesäuert, mit Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherauszüge werden im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird nach der Rundfilter-Methode chromatographiert oder mit 30 ccm Essigester aufgenommen und in der oben beschriebenen Art auf 6 Bögen SS 2043 b aufgetragen. Es wird absteigend mit 1.5-M Phosphatpuffer pH6 entwickelt. In etwa 24 Stunden hat sich die schneller wandernde Substanz A von der Substanz B getrennt. Beide Substanzen werden getrennt mit 1 proz. Natriumbicarbonatlösung eluiert, mit Salzsäure gefällt, mit Äther aufgenommen und im Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Aus Ameisensäure wird umkristallisiert.

A: Schmp. 124-126° (Zers.) Ausbeute A + B 183 mg 70% d.Th. (bezogen auf XVI)
B: Schmp. 132-134° (Zers.) Mengenverhältnis A:B = 3:4

$C_{19}H_{18}O_{12}N_6$ (522.4) Ber. C 43.69; H 3.48; N 16.09
A Gef. C 43.91; H 3.87; N 15.41
B Gef. C 43.45; H 3.92; N 15.36

Nach nochmaligem Umkristallisieren wurden für N die gleichen Analysenergebnisse erhalten. Auch die Erfahrungen anderer Autoren [39] lassen erkennen, dass die nach DUMAS ermittelten Stickstoffwerte von DNP-Aminosäuren meist zu niedrig liegen.

Die Umsetzung des auf anderen Wegen gewonnenen $\beta$-Carboxy-lysins mit Dinitrofluorbenzol, erfolgt in gleicher Weise.

[39] G.Braunitzer, M.P.I. für Biochemie, private Mitteilung.

Enzymatische Oxydation der 3-Hydroxy-anthranilsäure.

Als Enzympräparat wird ein wässriger Extrakt des Acetontrockenpulvers von Schweineleber verwendet. Frische Schweineleber wird bei 0° homogenisiert und fünfmal mit etwa 4 l kaltem Aceton aufgeschlämmt und filtriert. Der Rückstand wird bei 0° getrocknet und bei -40° aufbewahrt. Durch Lagern bei tiefer Temperatur kann man die Enzymaktivität über einige Monate praktisch unverändert erhalten. Aufbewahren bei 0° führt zu einer stetigen Verminderung der enzymatischen Wirksamkeit.

Der wässrige Extrakt wird unmittelbar vor dem Enzym-Versuch hergestellt. Es werden 5 g Acetontrockenpulver mit 100 ccm 1/60-M Phosphatpuffer $p_H$ 7.4 oder, bei sogenannten salzfreien Ansätzen, 10 g Acetontrockenpulver mit 100 ccm destilliertem Wasser $p_H$ 6.7 30 Minuten in der Kälte gerührt, dann wird zentrifugiert und der klare Überstand, 85 ccm, unter Rühren mit 50 mg 3-Hydroxy-anthranilsäure inkubiert.

Der Reaktionsverlauf wird spektrophotometrisch verfolgt. Zur Messung der Absorption werden 0.05 ccm der Inkubationslösung entnommen, mit 1/60-M Phosphatpuffer $p_H$ 7.4 auf 5 ccm aufgefüllt und sofort in 20 mm Küvetten im Eppendorf-Photometer bei 366 mμ gemessen. Die Aufnahme des U.V.-Spektrums der Messlösung erfolgt in 20 mm Küvetten im Zeiss-Spektrophotometer.

Abtrennung der Proteine der Inkubationslösung.

a) Die salzfreie Inkubationslösung wird mit gleichem Volumen eiskalter 80 proz. Phenollösung 10 Minuten geschüttelt. Nach Zentrifugieren bei 0° wird die wässrige Phase (etwa 80 ccm, $p_H$ 6.6) isoliert und viermal mit peroxydfreiem Äther gewaschen. Durch Messen der U.V.-Absorption bei 360 mμ (0.05 ccm der wässrigen Phase mit 1/60-M Phosphatpuffer $p_H$ 7.4 auf 5 ccm auffüllen, in 20 mm Küvette im Zeiss-Spektrophotometer) wird die Konzentration ermittelt und durch Vergleich mit der Extinktion $_{360}$ der Ausgangslösung wird die Ausbeute bestimmt. Ausbeute 70-80%.

b) Die Inkubationslösung (salzfrei) wird lyophilisiert und der Trockenrückstand mit 50 ccm eiskaltem Methanol digeriert. Man zentrifugiert bei 0° und dekantiert die methanolische Lösung des Zwischenproduktes. Ausbeutebestimmung wie bei a). Ausbeute 20-30%.

Die mässige Ausbeute ist z. T. darauf zurückzuführen, dass etwa 20% des ursprünglich in der Inkubationslösung vorhandenen Zwischenproduktes fest am Eiweiss haftet und nur mit Wasser in Lösung zu bringen ist, wobei auch das Protein wieder gelöst wird.

c) Der Rückstand der Gefriertrocknung wird mit wenig Wasser aufgenommen und bei 0° gegen 50 ccm Wasser 2 Stunden dialysiert. Ausbeute etwa 30% (Methode s. a)).

d) Das Eiweiss der mit Phosphatpuffer angesetzten Inkubationslösungen wird nach WISS und BETTENDORF [14] mit 10 ccm 50 proz. Trichloressigsäure ausgefällt.

Modellversuche. Darstellung der 2.4-Dinitrophenylhydrazone in Gegenwart von saurem Ionenaustauscher.

50 mg (0.4 mM) Laevulinsäure, 100 mg (0.5 mM) 2.4-Dinitrophenylhydrazin und 1 g Dowex 50 x 2 (200-400 mesh) ($H^+$-Form) werden in 10 ccm Alkohol 30 Minuten bei 0° oder bei Zimmertemperatur gerührt. Es wird filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Aus dem Rückstand wird durch Umkristallisieren aus Alkohol/Wasser das Dinitrophenylhydrazon der Laevulinsäure isoliert und durch Schmelzpunkt und I.R.-Spektrum identifiziert. Ausbeute 90% d. Th.

Wenn man die gleiche Reaktion in siedendem Methanol oder Äthanol durchführt, so erhält man das Dinitrophenylhydrazon des entsprechenden Laevulinsäure-Esters, das in Benzol gelöst und an Aluminiumoxyd („Woelm", sauer, Aktivität III) chromatographiert wird. Die Schmelzpunkte der Dinitrophenylhydrazone des Methyl- bzw. Äthylesters entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten [40,41].

Ein analoges Verfahren unter Verwendung von Butanol als Lösungsmittel ermöglicht eine schonende Extraktion einer Carbonylverbindung aus wässriger Lösung. Wird Sorinal als Modell-Aldehyd eingesetzt, so kann die Bildung des entsprechenden Dinitrophenylhydrazons spektrophotometrisch durch Messen der Absorptionsbande bei 390 mμ verfolgt werden (vgl. folgende Versuchsbeschreibung).

Darstellung des α-Amino-β-carboxy-muconsäure-halbaldehyd-(ω)-dinitrophenylhydrazons (VI). Dinitrophenylhydrazon des Zwischenproduktes.

Die mit Phenol behandelte Inkubationslösung, oder die durch Dialyse erhaltene Lösung des Zwischenproduktes, wird mit 5 g Dowex 50 x 2 (200-400 mesh) ($H^+$-Form) und 40 ccm einer eiskalten gesättigten Lösung von Dinitrophenylhydrazin in n-Butanol (etwa 80 mg/100 ccm) versetzt und in der Kälte geschüttelt.

---

40 W. Treibs, Liebigs Ann. Chem. 576, 116 (1951)

41 A. Spence et al., J. Am. chem. Soc. 66, 1624 (1944)

In Abständen von 15-30 Minuten werden der butanolischen Phase 0.05 ccm entnommen, mit Methanol auf 5 ccm aufgefüllt und zur Aufnahme der U.V.-Spektren in 20 mm Küvetten im Zeiss-Photometer gemessen. Wenn als Bezugslösung 0.5 ccm der butanolischen Dinitrophenylhydrazin-Lösung/5 ccm Methanol verwendet wird, tritt ein Absorptionsmaximum bei 450 mμ auf. Die maximale Extinktion $_{450}$ ($\log I_0/I$ = 0.130 bis 0.150) wird nach etwa 2 ½ Stunden erreicht. Dann filtriert man die Reaktionslösung, trennt die wässrige Phase ab und wäscht die butanolische Phase zweimal mit je 5 ccm Wasser. Die butanolische Lösung wird gleich hydriert, oder man fällt zunächst das Dinitrophenylhydrazon mit 150 ccm Petroläther und filtriert nach mehrstündigem Stehen bei 0°. Zur Messung der U.V.-Absorption und zum Hydrieren wird der Niederschlag in Methanol gelöst.

Wenn eine alkoholische Lösung des Zwischenproduktes durch Extraktion des Rückstandes der Gefriertrocknung mit Methanol gewonnen wurde, so lässt man die Umsetzung mit Dinitrophenylhydrazin in dieser Lösung bei 0° ablaufen, gemäss der entsprechenden Methode der Modellversuche. Nach einer Stunde wird filtriert und das Filtrat hydriert.

Darstellung und Hydrierung der Modellsubstanz Sorbinol-dinitrophenylhydrazon.

500 mg Sorbinol und 8 g Braunstein werden in 25 ccm Petroläther 45 Minuten gerührt. Die Darstellung des Braunsteins erfolgt nach der Vorschrift von ATTENBURROW [32]. Handelsüblicher Braunstein wirkte nicht oxydierend.

Nach Ablauf der Reaktion wird filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Ein Teil des Rückstandes wird zur Identifizierung des Sorbinols als Semicarbazon [31] verwendet, der Rest wird nach der üblichen Methode mit Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. Das Dinitrophenylhydrazon wird aus Äthanol umkristallisiert und mit Benzol an Aluminiumoxyd („Woelm", sauer, Aktivität III) chromatographiert. Schmp. 184°; $\lambda_{max}$ 390 mμ. (in Äthanol).

Zur Kontrolle der anschliessenden Hydrierung wurde eine Mikrobestimmung von n-Hexylamin neben Triaminobenzol und anderen Reaktionsprodukten der reduktiven Spaltung ausgearbeitet.

a) 16 mg n-Hexylamin werden mit 20 ccm gesättigter wässriger Pikrolonsäurelösung versetzt und 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das ausgefallene Pikrolonat wird abfiltriert. Schmp. 188° [42]. Ausbeute 44 mg, 77% d.Th.

[42] P. Karer, Helv.chim.Acta 5, 832 (1922)

b) 18 mg n-Hexylamin werden mit Salzsäure versetzt. Die Lösung wird eingedampft, der Rückstand in eine Wasserdampfdestillationsapparatur (nach Markham) eingebracht und mit Bariumhydroxyd alkalisiert. Der Wasserdampf wird eingeleitet und die ersten 5 bis 8 ccm des Destillates werden in 20 ccm gesättigter wässriger Pikrolonsäurelösung aufgefangen. Nach 12stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird das Hexylamin-Pikrolonat abfiltriert. Ausbeute 50-60% d.Th.

Das Sorbinal-Dinitrophenylhydrazon wird mit Platin-Katalysator nach ADAMS 10 Stunden in methanolischer Lösung hydriert, es wird kurz unterbrochen, um 2 ccm Salzsäure in 10 ccm Methanol der Lösung zusetzen zu können, dann wird die Hydrierung fortgesetzt. Die Reaktion ist nach weiteren 10 Stunden beendet, man dampft im Vakuum ein und bestimmt die Ausbeute an n-Hexylamin nach der oben beschriebenen Methode.
Ausbeute 50-70% (Berechnung unter Berücksichtigung des in den Vorversuchen ermittelten Verlustfaktors der Methode).

Hydrierung des Dinitrophenylhydrazons des Zwischenproduktes und anschliessende Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol.

Platinkatalysator nach ADAMS wird in 10 ccm Methanol vorhydriert. Nach Zufügen der butanolischen oder methanolischen Lösung des nach S. 36 gewonnenen Dinitrophenylhydrazons wird weiterer Wasserstoff eingeleitet. Wenn die Lösung farblos geworden ist (nach etwa 12 Stunden) werden 4 ccm konz. Salzsäure in 10 ccm Methanol zugesetzt. Die Gesamtdauer der Hydrierung beträgt 24-36 Stunden. Anschliessend destilliert man den Alkohol ab, kocht den Rückstand 3 Stunden mit konz. Salzsäure und dampft im Vakuum zur Trockene ein.

a) Das Hydrolysat wird nach SANGER [28] mit 0.8 g Natriumbicarbonat 8 ccm Wasser und einer Lösung von 0.8 ccm Dinitrofluorbenzol in 16 ccm Äthanol 2 Stunden geschüttelt. Die sauren ätherlöslichen DNP-Derivate werden in der üblichen Weise isoliert und chromatographiert.

b) Das Hydrolysat wird durch mikropräparative Papierchromatographie mit dem System Phenol-Boratpuffer gereinigt. Die Substanzen, die eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit zeigen wie $\beta$-Carboxy-lysin, werden mit verdünnter Salzsäure eluiert. Das Lösungsmittel dampft man im Vakuum ab und setzt den Rückstand nach der üblichen Methode im Autotitrator mit Dinitrofluorbenzol um.

Papierchromatographie und Elektrophorese.

Es wird die Papiersorte Schleicher und Schüll 2043b verwendet. Die Aminosäuren werden nach der Methode der absteigenden Papierchromatographie mit den von LEVY und CHUNG [43] beschriebenen und von BRAUNITZER [44] modifihierten Systemen entwickelt:

1. Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5)
2. Phenol-Boratpuffer $p_H$ 9.3 (80 g Phenol + 20 g Boratpuffer $p_H$ 9.3 hergestellt aus 200 g Borsäure und 113.5 ccm 0.1-M Natronlauge.)

Die DNP-Aminosäuren werden nach der Methode der absteigenden Papierchromatographie mit den von BRAUNITZER [44] beschriebenen Systemen entwickelt:

1. Butanol-Ammoniak. (Obere Phase, die beim Ausschütteln von gleichen Teilen Butanol und 0.1 proz. Ammoniaklösung entsteht.)
2. 1.5-M Phosphatpuffer $p_H$ 6 (155.9 g primäres Natriumphosphat + 89.0 g sekundäres Natriumphosphat mit Wasser auf 1 l auffüllen.)

Die Dinitrophenylhydrazone werden nach der Methode der absteigenden Papierchromatographie bei 0° mit dem von CAVALLINI et al. [45] beschriebenen System entwickelt:

Butanol-Wasser-Äthanol (5 : 4 : 1)

Die Wanderungsstrecken bei der Papierchromatographie von Aminosäuren und DNP-Aminosäuren sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. (Durchlaufmethode).

| Butanol-Eisessig-Wasser | | Phenol-Boratpuffer | |
|---|---|---|---|
| β-Carb.-lysin | 3.8 cm | Asp | 8.0 cm |
| Lys | 5.2 | Glu | 15.0 |
| Asp | 9.5 | β-Carb.-lys. | 18.2 |
| Gly | 10.9 | Gly | 25.0 |
| Thr | 13.2 | Thr | 28.5 |
| Glu | 13.6 | Lys | 33.2 |
| δ-Amino-valsre. | 25.5 | Val | 41.2 |
| Val | 27.5 | δ-Amino-valsre. | 43.5 |
| Leu | 35.6 | Leu | 44.3 |

---

[43] A. Levy u. D. Chung, Anl. Chem. 25, 396 (1953)
[44] G. Braunitzer, Chem. Ber. 88, 2025 (1953)
[45] D. Cavallini et al., Nature (London) 164, 792 (1949)

| Butanol-Ammoniak | | 1.5-M Phosphatpuffer $p_H$ 6 | | |
|---|---|---|---|---|
| DNP-Asp | 0.9 cm | Bis-DNP-Lys | | 0.4 cm |
| Bis-DNP-β-Carb-lys | 3.8 | Bis DNP-β-Carb.-lys | B | 11.1 |
| | | | A | 17.0 |
| DNP-Gly | 10.9 | DNP-Gly | | 18.5 |
| DNP-Ala | 16.5 | DNP-OH | | 18.5 |
| DNP-OH | 21.5 | DNP-Ala | | 23.5 |
| DNP-Val | 24.0 | DNP-Val | | 25.4 |
| Bis-DNP-Lys | 32.5 | DNP-Asp | | 40.0 |

Zur Rundfilterchromatographie wird die Substanz (0.5 mMol Bis-DNP-β-Carboxy-lysin) auf 20 geviertelte und zentral durchbohrte Chromatographiepapiere [46] aufgetragen und mit 500 ccm 1.5-M Phosphatpuffer $p_H$ 6 entwickelt.

Die Papierelektrophorese wird unter Toluol als Hochspannungselektrophorese durchgeführt. Für Aminosäuren wird das von RYLE et al. [47] entwickelte und von SIMON [48] modifizierte System
Pyridin-Acetat $p_H$ 6.3 verwendet. (2.5% Pyridin + 0.1% Essigsäure)
Wanderungsstrecken bei 4600 V, 30 Minuten:
Asp 14 cm zur Anode
Leu, Val u.a. neutr. Aminosäuren 1.9 cm zur Kathode
β-Carboxy-lysin 2.4 cm zur Kathode
Lysin 17 cm zur Kathode

Für DNP-Aminosäuren wird das von LIEBOLD und SIMON [48] entwickelte System
Triäthylamin-Pyridin-Ameisensäure verwendet. (240 g Harnstoff + 100 ccm Pyridin + 8.0 ccm Triäthylamin + 2.0 ccm 98proz. Ameisensäure mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit Triäthylamin auf $p_H$ 9.0 gebracht.)
Wanderungsstrecken bei 1800 V, 80 Minuten
Bis-DNP-β-Carboxy-lysin A 12.5 cm zur Anode
Bis-DNP-β-Carboxy-lysin B 12.5 cm zur Anode

---

[46] H. Brockmann et al., Naturwissenschaften 40, 221 (1953)
[47] A. P. Ryle et al., Biochem. J. 60, 541 (1955)
[48] G. Liebold, K. Simon M. P. I. für Biochemie, unveröffentlicht.

## Zusammenfassung

1. Das bisher unbekannte β-Carboxy-lysin wurde auf drei voneinander unabhängigen Wegen synthetisiert (s. Formelschema). Die beiden zu erwartenden Diastereomeren dieser Diamino-dicarbonsäure liessen sich als DNP-Derivate trennen und charakterisieren.

Kondensation von Oxalester mit N-Acyl-δ-amino-valeriansäure-ester. Die auf diesem Wege dargestellten Phenylhydrazone (XVIII, XVIII a, XVIII b) der α-Keto-Analogen von β-Carboxy-lysin-Derivaten tendieren als Oxalessigester-Derivate zur Pyrazolonbildung. Diese bei der reduzierenden Spaltung zu β-Carboxy-lysin unerwünschte Konkurrenzreaktion konnte durch Hydrieren in einem geeigneten Lösungsmittel teilweise vermieden werden.

Kondensation von Oxalester mit N-Acyl-δ-amino-valeriansäure-lactam. Die Reaktionsfolge führte zum Dinitrophenylhydrazon eines cyclischen α-Keto-Analogen eines β-Carboxy-lysin-Derivates (XVII). Es konnte in guter Ausbeute zu β-Carboxy-lysin reduziert werden, da die intramolekulare Amid-Bindung der β-Carboxylgruppe eine Pyrazolonbildung verhindert.

Kondensation von Acylamino-malonester mit α-Brom-δ-phthalimido-valeriansäure-ester. Durch Verseifen und Decarboxylieren des Kondensationsproduktes (XVI) wurde β-Carboxy-lysin in praktisch quantitativer Ausbeute erhalten. Es wurde gezeigt, dass diese, zur Darstellung von β-Carboxy-lysin günstigste Methode auch allgemein zur Synthese β-substituierter Asparaginsäure verwendet werden kann. Hierdurch ist die Anwendbarkeit der Acylaminomalonester-Kondensation erweitert worden.

2. Das enzymatische Oxydationsprodukt der 3-Hydroxy-anthranilsäure wurde als Dinitrophenylhydrazon isoliert, das anschliessend zu β-Carboxy-lysin hydriert werden konnte. Die auf diesem Wege aus enzymatischem Ansatz gewonnene Aminosäure wurde, wie die Vergleichssubstanz, in die beiden Diastereomeren Bis-DNP-β-carboxy-lysin A und B aufgetrennt. Damit konnte erstmalig bewiesen werden, dass das Oxydationsprodukt die Struktur eines α-Amino-β-carboxy-muconsäure-halbaldehyds-(ω) besitzt.

Die angewandten Methoden ermöglichten eine schonende Aufarbeitung. Die spektrophotometrische Kontrolle bestätigte, dass die Struktur des instabilen Zwischenproduktes dabei erhalten blieb.

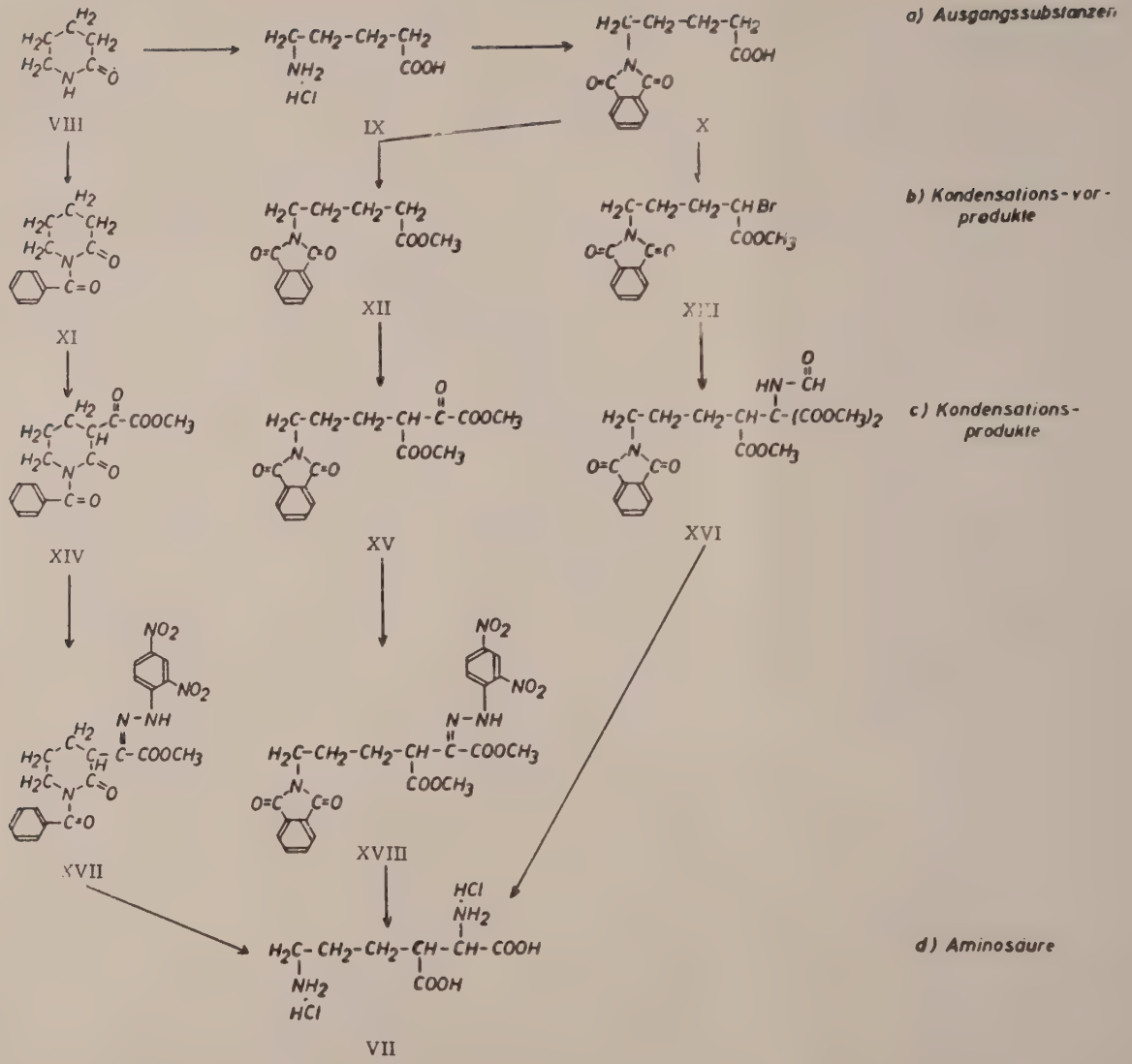
Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Umsetzung einer Carbonylverbindung mit Dinitrophenylhydrazin in Gegenwart sauerer Ionenaustauscher

kann, wie gezeigt wurde, allgemein zur Dinitrophenylhydrazon-Darstellung verwendet werden.

Die nach den Werten der U.V.-Absorption (Tab. 1 und Abb. 9) zu vermutende Struktur des Oxydationsproduktes und seines Dinitrophenylhydrazons wurde durch papierchromatographische und spektrophotometrische Vergleiche des zur Diamino-dicarbonsäure reduzierten Dinitrophenylhydrazons mit autentischem $\beta$-Carboxy-lysin endgültig bewiesen.

3. Von den in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen wurden die folgenden erstmalig dargestellt:

$\delta$-Phthalimido-valeriansäure-methylester (XII)
$\delta$-Benzamino-valeriansäure-methylester (XII a)
$\alpha$-Brom-$\delta$-phthalimido-valeriansäure-methylester (XIII)
N-Benzoyl-3-methoxalyl-piperidon-(2) (XIV) und das entsprechende 2.4-Dinitrophenylhydrazon (XVII)
$\delta$-Phthalimido-$\alpha$-methoxalyl-valeriansäure-methylester (XV) und das entsprechende Dinitrophenylhydrazon (XVIII)
$\delta$-Benzamino-$\alpha$-methoxalyl-valeriansäure-methylester-phenylhydrazon (XVIII a) und 2.4-dinitrophenylhydrazon (XVIII b)
$\varepsilon$-Phthalimido-$\alpha$, $\beta$-dicarbomethoxy-capronsäure-methylester
$\alpha$-Formamino-$\alpha$, $\beta$-dicarbomethoxy-valeriansäure-methylester
$N^{\alpha}$-Formyl-$N^{\delta}$-phthalyl-$\alpha$, $\beta$-dicarbomethoxy-lysin-methylester (XVI)
$\beta$-Carboxy-lysin (VII) und seine diastereomeren Bis-DNP-Derivate
$\alpha$-Amino-$\beta$-carboxy-muconsäure-halbaldehyd-($\omega$)-dinitrophenylhydrazon (VI)


a) Ausgangssubstanzen
b) Kondensations-vor-produkte
c) Kondensations-produkte
d) Aminosäure
VIII
IX
X
XI
XII
XIII
XIV
XV
XVI
XVII
XVIII
VII

## Lebenslauf

Meine Eltern, Emil Kuss und Martha Kuss, geb. Spreckelmeier, wohnen in Wanne-Eickel. Mein Vater wurde 1946 von der Bundesbahn pensioniert. Von vier Kindern der Familie leben noch zwei.

Ich wurde am 14. VI. 1927 in Wanne-Eickel geboren. Dort besuchte ich die Grundschule und, ab 1937, die Oberschule. 1943/44 war ich als Luftwaffenhelfer eingesetzt. 1944 erhielt ich, nach der Versetzung in die achte Klasse, den Reifevermerk und wurde zum Arbeitsdienst und später zur Wehrmacht einberufen.

Ende 1948 kehrte ich aus der Gefangenschaft zurück und besuchte anschliessend einen Förderkurs, 1949 erhielt ich das Reifezeugnis des Gymnasiums Herten.

Zum Wintersemester 1950/51 begann ich an der Technischen Hochschule Darmstadt das Chemiestudium, ausserdem belegte und hörte ich Vorlesungen aus dem Gebiet der Biologie. Im Februar 1953 bestand ich dort die Diplom-Chemiker-Vorprüfung.

Während der folgenden zwei Semester studierte ich Chemie und Medizin an der Universität Münster, dann an der Universität Tübingen, wo ich 1955 das Diplom-Chemiker-Examen und 1956 die ärztliche Vorprüfung bestand.

Ab Juli 1955 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Professor Dr. Butenandt an meiner Diplom- und Doktorarbeit. 1956 folgte ich dem Umzug des Institutes nach München. Seitdem bin ich als ordentlicher Studierender der Universität München eingeschrieben.